

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

**Utilisation de la technique du double hybride en levure pour évaluer l'homo- ou l'hétérodimérisation des récepteurs WAKs (Wall-Associated Kinases) associés à la paroi végétale**

Remy, Stéphanie

*Award date:*  
2009

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Utilisation de la technique du double hybride en levure pour évaluer l'homo- ou  
l'hétérodimérisation des récepteurs WAKs (Wall-Associated Kinases)  
associés à la paroi végétale**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire**

Stéphanie Remy

Janvier 2009

*Je remercie le Professeur Van Custem de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.*

*Je remercie le Professeur Messiaen de m'avoir encadrée et d'avoir passé du temps à la correction de ce manuscrit. Merci d'avoir de temps en temps joué le rôle de l'avocat du diable sous une note humoristique.*

*Je tiens également à remercier les membres du Jury pour le temps consacré à la lecture de ce mémoire.*

*Pour Aurélien, aucun mot, ni aucun geste ne pourrait être à la hauteur de toute l'aide que tu m'as apportée. Je ne te remercierai jamais assez pour tes conseils judicieux, ton suivi exceptionnel tant pour les manipulations au laboratoire que pour la correction de ce manuscrit. Encore merci pour ta bonne humeur journalière malgré ta surcharge de travail. Merci pour tout.*

*Je remercie Nicolas, Céline et le Professeur De Bolle de m'avoir conseillée lors des constructions plasmidiques.*

*Je remercie Pierre et Françoise d'avoir toujours été présent. Merci Pierre pour ton aide, tes conseils et ta bonne humeur. Merci Françoise de m'avoir initiée au programme Canvas, de m'avoir accordée du temps pour les petits soucis de la mise en page de ce manuscrit.*

*Je remercie tous les autres membres du laboratoire d'avoir participé à cette expérience de fin d'études.*

*Je tiens aussi à remercier Boris d'avoir toujours été présent quand j'en avais besoin. Merci pour tes précieux conseils, ton soutien.*

*Je remercie Sophie de m'avoir aidée chaque fois que je prévoyais des journées impossibles à réaliser seule.*

*Merci à Boris, Sophie et Anne Florence d'avoir créé une agréable ambiance de travail entrecoupé de petites pauses souvent hilarante. Merci d'avoir participé à cette belle expérience.*

*Je remercie mes parents d'avoir cru en moi il y a 6 ans, de m'avoir permis de réaliser ces études, de m'avoir soutenu et encouragée. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir permis de réaliser mon rêve, un métier que j'aime.*

*Je remercie Hugue de m'avoir guidée tout au long de ces années d'études et d'avoir été présent pour l'aboutissement de ce mémoire.*

*Je tiens aussi à remercier Samia pour tes conseils lors de la rédaction de ce manuscrit.*

*Merci à toutes les personnes qui ont participées à la bonne réalisation de ce mémoire.*

*Stéphanie*

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## **Utilisation de la technique du double hybride en levure pour évaluer l'homo- ou l'hétérodimérisation des récepteurs WAKs (Wall-Associated Kinases) associés à la paroi végétale**

Remy Stéphanie

### Résumé

En 2000, le séquençage du génome complet d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier 610 gènes codant pour des récepteurs transmembranaires de type kinase (RLKs) dont font partie les récepteurs kinases associés à la paroi végétale (WAKs). Les WAKs sont impliqués dans l'expansion cellulaire et la morphogénèse, mais également dans les réponses aux pathogènes. L'interaction de WAK1 avec des fragments de pectines en conformation « egg-box » de degré de polymérisation  $\geq 9$ , telles que ceux produits suite à une hydrolyse par des pectinases fongiques, confère aux cellules végétales la potentialité de percevoir et de signaler des événements de la paroi cellulaire vers le cytoplasme. Malgré la mise en évidence de l'interaction de WAK1 avec les pectines, la voie de transduction du signal relative à WAK1 n'est toujours pas identifiée. La plupart des RLKs actuellement caractérisés chez les plantes homo- ou hétérodimérisent pour initier la signalisation intracellulaire. Comme certains WAKs sont co-exprimés spatio-temporellement, nous avons utilisé la technique du double hybride en levure pour savoir si, comme la plupart des récepteurs, les WAKs sont capables d'homo ou d'hétérodimériser avec d'autres membres de la famille WAK.

Des homodimérisations du domaine extracellulaire de WAK1, et du domaine extracellulaire de WAK2, ainsi qu'une hétérodimérisation du domaine extracellulaire de WAK1 avec WAK2 ont été mises en évidence. Actuellement, nous confirmons ces interactions par la technique du GST Pull Down Assay.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire  
Janvier 2009

**Promoteur:** J. Messiaen

# Table des matières

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>I. Les pectines composant de la paroi cellulaire végétale .....</b>	<b>2</b>
A. Introduction .....	2
B. Structure des pectines .....	3
C. Rôle signalétique des pectines .....	4
1. Les réponses de défenses .....	4
a. Les réponses de défenses déclenchées par les OGAs .....	4
b. Les réponses de défenses déclenchées par les OGAs de $DP \leq 9$ .....	5
2. Les réponses se rapportant à la croissance et le développement végétale .....	5
a. Les réponses dans la croissance et le développement déclenché par les OGAs de $DP \geq 9$ .....	5
b. Les réponses dans la croissance et le développement déclenché par les OGAs de $DP \leq 9$ .....	5
D. Les candidats récepteurs d'OGAs .....	6
<b>II. Les récepteurs (like) kinases chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>7</b>
A. Introduction .....	7
B. Présentation de quelques classes de RLK .....	8
1. Les récepteurs kinases à domaine LRR .....	8
2. Les récepteurs de domaine S et les récepteurs de répétitions riches en cystéines .....	8
3. Les récepteurs kinases riches en prolines (PERK) .....	9
4. Les récepteurs CrRLK1 .....	9
C. Les WAKs : Wall-Associated Kinases .....	10
1. Introduction .....	10
2. Structure des WAKs .....	10
3. Expression et localisation des WAKs .....	11
4. Rôle des WAKs.....	11
a. Rôle des WAKs dans la croissance et le développement .....	11
b. Rôle des WAKs dans la défense contre les pathogènes .....	12
5. WAKs et signalisation .....	13
a. WAK1 : un bon candidat de récepteur aux OGAs .....	13
b. Interaction entre le domaine extracellulaire de WAK1 avec AtGRP3/KAPP .....	14
c. Interaction entre le domaine intracellulaire de WAK1 et OEE2 .....	14
<b>III. Objectifs .....</b>	<b>15</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>16</b>
I. Souches utilisées .....	17
A. Bactéries <i>E. coli</i> TOP10F' .....	17
B. Levures <i>MaVI03</i> .....	17
C. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	17
II. Milieux de croissance .....	17
A. Milieux pour bactéries .....	17
B. Milieux pour levures .....	17
C. Milieu pour plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18

<b>III. Liste de Kits utilisés .....</b>	<b>18</b>
<b>IV. Transformations par choc thermique.....</b>	<b>18</b>
A. Transformation d' <i>E. coli</i> TOP10F' .....	18
B. Transformation de levure MaV103 (Méthode LiAc) .....	19
<b>V. Méthodes relatives aux acides nucléiques .....</b>	<b>20</b>
A. Extraction d'ARN des plantules d' <i>A. thaliana</i> .....	20
B. Rétrotranscription .....	21
C. Réaction PCR .....	21
D. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	22
E. Restrictions enzymatiques .....	22
F. Ligation des <i>EC WAKs</i> dans PGBKT7 et pACT2 .....	22
G. Réaction de séquençage .....	23
<b>VI. Méthodes relatives aux protéines .....</b>	<b>24</b>
A. Extraction de protéines à partir de levures MaV103.....	24
B. Western blot .....	25
1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide .....	25
2. Coloration des protéines au bleu de Coomassie.....	25
3. Western blot-semy-dry.....	25
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>27</b>
<b>I. Amplification des <i>EC WAKs</i> d'<i>A. thaliana</i> .....</b>	<b>31</b>
A. Conception des amorces pour l'amplification des <i>EC WAKs</i> .....	31
B. Extraction d'ARN totaux et RT-PCR .....	32
<b>II. Fusion des <i>EC WAKs</i> avec BD ou AD .....</b>	<b>33</b>
A. Clonage des <i>EC WAKs</i> dans PCRII .....	33
B. Clonage des <i>EC WAKs</i> dans le plasmide PGBKT7 .....	34
C. Clonage des <i>EC WAKs</i> dans le plasmide pACT2 .....	35
<b>III. Co-transformation de MaV103 avec les constructions appât et proie .....</b>	<b>36</b>
A. Transformation des MaV103 avec <i>EC WAKs</i> -PGBKT7 .....	36
1. Transformation des MaV103 avec <i>EC WAKs</i> -PGBKT7 .....	36
2. Test d'expression des <i>EC WAKs</i> -BD .....	36
3. Test de toxicité des <i>EC WAKs</i> -PGBKT7 .....	37
4. Test d'auto-activation de la protéine appât fusionnée à BD .....	38
B. Transformation des MaV103 [ <i>EC WAKs</i> -PGBKT7] avec <i>EC WAKs</i> -pACT2 .....	39
<b>IV. Tests d'interactions protéine/protéine .....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>42</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>47</b>

## **Abréviations :**

RLK : Receptor Like Kinase  
WAK : Wall-Associated Kinase  
WAKL : Wall-Associated Kinase Like  
OGA : Oligogalacturonide  
PGA : Polygalacturonide  
HG , HGA : Homogalacturonane  
RG-I : Rhamnogalacturonane I  
RG-II : Rhamnogalacturonane II  
PR : protéine en rapport avec la pathogénèse  
DP : Degré de Polymérisation  
PERK : Proline-Rich, Extensine-Like Receptor Kinase  
BRI1 : Brassinosteroid Insensitive 1 Receptor  
BAK1 : Brassinosteroid insensitive 1 Associated receptor Kinase 1  
BIN2 : Brassinosteroid Insensitive 2  
LRR : Leucine-Rich Repeat domain  
FSL2 : Flagellin Sensitive 2 receptor kinase  
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase  
WRKY : famille de facteurs de transcriptions  
SRK : S-locus Receptor Kinase  
eSRK : extracellular domain of SRK  
CrRLK1 : Receptor Like Kinase of *Catharanthus roseus*  
AtGRP3 : Protéine Riche en Glycine 3  
LHCP : Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein  
KAPP : Kinase-Associated protein phosphatase  
OEE2 : Oxygen Evolving Enhancer protein 2  
MEC : Matrice Extracellulaire  
HR : Réponse Hypersensible  
SAR : Résistance Systémique Acquise  
NPR1 : Nonexpresser of PR genes

EC WAK : séquence codant pour le domaine extracellulaire des WAKs, excepté le peptide signal

EC WAK : domaine extracellulaire des WAKs, excepté le peptide signal

P : peptide signal

EC : domaine extracellulaire

EGF : domaine EGF

IC : domaine intracellulaire

TM : domaine transmembranaire

Sc-Trp/-Leu/-Ura : milieu sélectif déplété en tryptophane, leucine et uracile

Sc-Trp/-Leu/-Ura + 5FOA : milieu sélectif déplété en tryptophane, leucine et uracile avec du 5'FOA

Sc-Trp/-Leu/-His : milieu sélectif déplété en tryptophane, leucine et histidine

Sc-Trp/-Leu/-His + 20, 40, 60, 80, 100 mM 3AT : milieu sélectif déplété en tryptophane, leucine et histidine avec une concentration de 20, 40, 60, 80 et 100 mM de 3AT

Sc-Trp/-Leu + X-gal : milieu sélectif en tryptophane, leucine avec du X-gal

YEPD + 5FOA : milieu non sélectif contenant du 5 FOA

P53/SV40 : interaction entre P53 et SV40

WAK1/WAK1 : interaction entre domaine extracellulaire de WAK1

WAK1/WAK2 : interaction entre le domaine extracellulaire de WAK1 et le domaine extracellulaire de WAK2

WAK2/WAK1 : interaction entre le domaine extracellulaire de WAK2 et le domaine extracellulaire de WAK1

WAK2/WAK2 : interaction entre domaine extracellulaire de WAK2

Y2H : système double hybride en levure

DB-X : domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p fusionné à une protéine X

AD-Y : domaine activateur de la transcription du facteur de transcription Gal4p fusionné à une protéine Y

AD : domaine activateur du facteur de transcription Gal4p

BD : domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p

EC WAK-AD : domaine extracellulaire des WAKs fusionné au domaine d'activation du facteur de transcription Gal4p

EC WAK-BD : domaine extracellulaire des WAKs fusionné au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p

EC WAK-GST : fusion du domaine extracellulaire de WAK avec la GST

PGBKT7 : plasmide permettant la fusion du domaine extracellulaire des WAKs avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p

pACT2 : plasmide permettant la fusion du domaine extracellulaire des WAKs avec le domaine activateur du facteur de transcription Gal4p

EC WAK1<sub>23-341</sub> : acides aminés 23 à 341 du domaine extracellulaire de WAK1

EC WAK2<sub>23-339</sub> : acides aminés 23 à 339 du domaine extracellulaire de WAK2

EC WAK3<sub>23-333</sub> : acides aminés 23 à 333 du domaine extracellulaire de WAK3

EC WAK4<sub>23-340</sub> : acides aminés 23 à 340 du domaine extracellulaire de WAK4

EC WAK5<sub>23-339</sub> : acides aminés 23 à 339 du domaine extracellulaire de WAK5

MaV103 [vide] : levure MaV103 ne contenant aucun plasmide

MaV103 [EC WAK1-BD] : levure MaV103 contenant la protéine de fusion EC WAK1-BD

MaV103 [EC WAK2-BD] : levure MaV103 contenant la protéine de fusion EC WAK2-BD

MaV103 [EC WAK1-PGBKT7] : levure MaV103 contenant le plasmide EC WAK1-PGBKT7

MaV103 [EC WAK2-PGBKT7] : levure MaV103 contenant le plasmide EC WAK2-PGBKT7

MaV103 [P53-PGBKT7/SV40-pGADT7] : levure MaV103 contenant le plasmide P53-PGBKT7 et le plasmide SV40-pGADT7

MaV103 [EC WAK1-PGBKT7/EC WAK1-pACT2] : levure MaV103 contenant le plasmide EC WAK1-PGBKT7 et le plasmide EC WAK1-pACT2

MaV103 [EC WAK1-PGBKT7/EC WAK2-pACT2] : levure MaV103 contenant le plasmide EC WAK1-PGBKT7 et le plasmide EC WAK2-pACT2

MaV103 [EC WAK2-PGBKT7/EC WAK1-pACT2] : levure MaV103 contenant le plasmide EC WAK2-PGBKT7 et le plasmide EC WAK1-pACT2

MaV103 [EC WAK2-PGBKT7/EC WAK2-pACT2] : levure MaV103 contenant le plasmide EC WAK2-PGBKT7 et le plasmide EC WAK2-pACT2

pUC : origine de réplication de plasmide

ADH1 : promoteur de l'alcool déshydrogénase 1

Kan<sup>r</sup> : marqueur permettant la résistance à la kanamycine



*Amp<sup>r</sup>* : marqueur permettant la résistance à l'ampicilline  
URA : uracile  
*URA3* : gène codant pour l'orotidine-5'phosphate décarboxylase  
HIS : histidine  
*HIS3* : gène codant pour l'imidazoleglycerol-phosphate déshydratase  
*LacZ* : gène codant pour la  $\beta$ -D-galactosidase  
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside  
5'FOA : acide 5-fluoro-orotique  
3AT : 3 amino-1,2,4-triazol  
DO<sub>260</sub> : Densité Optique prise à une longueur d'onde de 260 nm  
DO<sub>280</sub> : Densité Optique à une longueur d'onde de 280 nm  
BET : bromure d'éthidium  
RT-PCR : rétro-transcription  
GUS :  $\beta$ -D-glucuronidase  
ADNc : ADN complémentaire  
HA : Hémagglutinine  
YFP : Yellow Fluorescent Protein  
BiFC : Bimolecular Fluorescence Complementation  
SL : Smart Ladder  
bp : paire de bases  
kDa : kilo Dalton  
Kb : kilo base

# Introduction

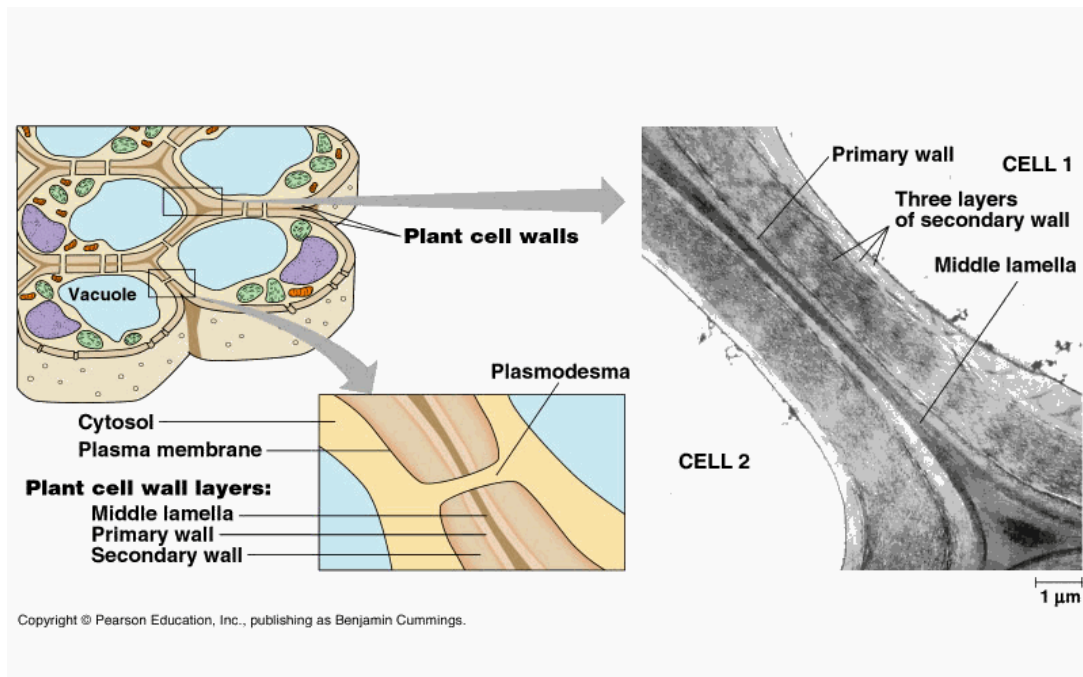


Figure 1. Les différentes parties de la paroi cellulaire végétale sont présentées de façon schématisée à gauche et vues au microscope électronique à transmission à droite (Campbell, 1995).

# **I. Les pectines composant de la paroi cellulaire végétale**

## **A. Introduction**

La paroi cellulaire est un compartiment dynamique qui change au cours de la vie d'une cellule végétale (Carpita and McCann, 2000). Elle ne définit pas seulement l'identité structurale et morphologique de la cellule végétale mais elle médie aussi le fonctionnement des cellules (Boudreau and Bissell, 1998). La paroi est constituée de la lamelle mitoyenne, de la paroi primaire et de la paroi secondaire (Fig. 1). La lamelle mitoyenne apparaît entre deux cellules adjacentes lors de la division cellulaire. La paroi primaire se développe rapidement pendant l'expansion cellulaire. Cette paroi contient essentiellement 3 sortes de polysaccharides : la cellulose, l'hémicellulose et la pectine (Cosgrove, 1997). Celles-ci sont présentes dans des proportions variables en fonction du stade de développement des cellules végétales (paroi primaire ou secondaire) (Carpita and McCann, 2000). Elle contient aussi des protéines de structure, d'enzymes et des protéines capables de lier la matrice extracellulaire à la membrane plasmique (Cosgrove, 2001). La paroi est majoritairement composée d'eau (60% en volume) et présente une faible proportion de minéraux. Ce n'est qu'au moment de la différenciation que certaines cellules élaborent une paroi secondaire, dont la structure et l'épaisseur dépendent de la fonction cellulaire (Carpita and McCann, 2000).

Dans les paragraphes qui vont suivre, nous nous focaliserons plus particulièrement sur les pectines étant à la fois un composant structurel important de la paroi et un composant signalétique interagissant avec le récepteur kinase associé à la paroi végétale (WAK1).

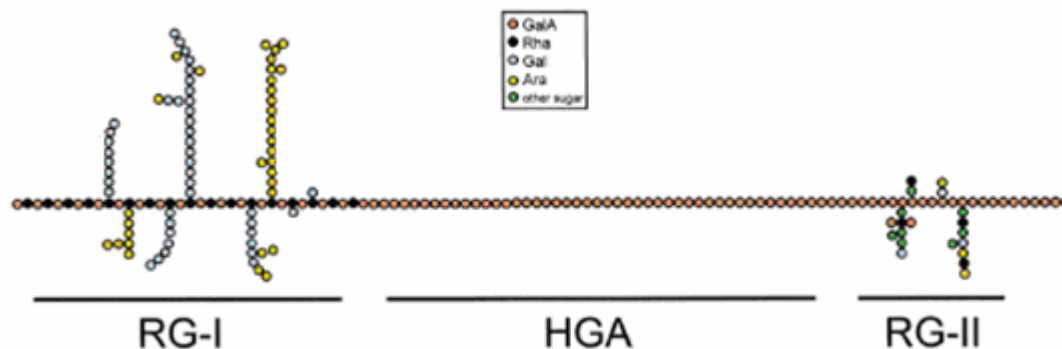


Figure 2. Schéma des 3 domaines pectiques : l'homogalacturonane (HGA), le rhamnogalacturonane I (RG-I) et le rhamnogalacturonane II (RG-II) selon Willats (2001). RG-I et RG-II sont liés de façon covalente aux HGAs mais il n'existe toujours pas de preuve d'un lien direct entre RG-I et RG-II.

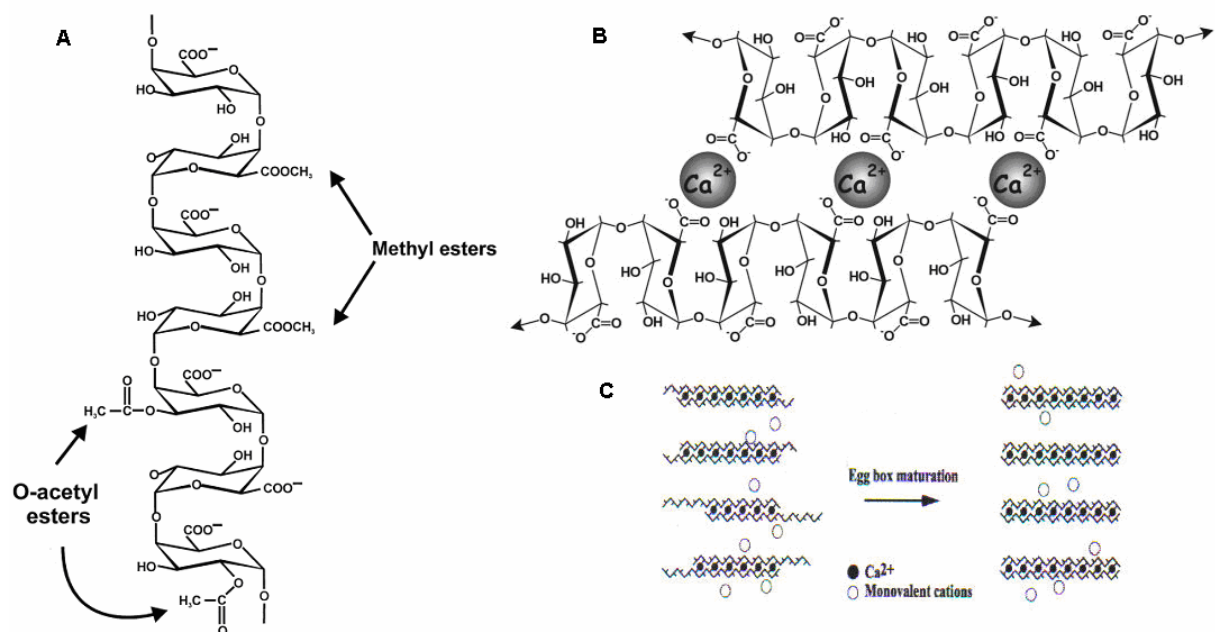


Figure 3. **A** : Structure primaire de l'homogalacturonane (Ridley *et al.*, 2001). L'homogalacturonane est un polymère linéaire de  $\alpha$  1,4-acide galacturonique. Les groupements carboxyliques peuvent être O-acétylés au niveau du carbone C2 ou C3. Ses groupements carboxyliques peuvent être méthyl estérifiés. **B** : Structure en « egg-box » (Vincken *et al.*, 2003). Les groupements non estérifiés des groupes carboxyles des résidus d'acides galacturoniques interagissent avec des ions calcium. La présence d'au moins 5 ions calcium est nécessaire pour avoir une conformation stable. **C** : Représentation schématique du modèle de la maturation des egg-box au cours du temps pour lequel le nombre de zones de jonctions augmentent progressivement pour finalement former des dimères parfaits (Cabrera *et al.*, 2008).

## B. Structure des pectines

Les pectines représentent une famille de polysaccharides riches en acides galacturoniques de structure complexe (Willats *et al.*, 2001). Elles jouent un rôle dans la croissance végétale, le développement, la morphogenèse, la défense, l'adhésion entre cellules, la structure de la paroi, la signalisation, l'expansion cellulaire, la porosité de la paroi et la liaison d'ions. Elles occupent environ 35 % de la masse sèche des parois végétales (Mohnen, 2008; Willats *et al.*, 2001).

Les trois polysaccharides pectiques majeurs sont l'homogalacturonane (HG), le rhamnogalacturonane I et le rhamnogalacturonane II. L'homogalacturonane est le plus abondant et possède une structure non ramifiée contrairement aux rhamnogalacturonanes I et II (**Fig. 2**) (Ridley *et al.*, 2001; Cosgrove, 1997). La synthèse des pectines requiert au moins 67 transférases incluant des glycosyl-, méthyl- et acétyltransférases localisées au niveau du Golgi (Mohnen, 2008). Après leur synthèse, les pectines peuvent être modifiées afin de faire varier les propriétés physiques de la paroi végétale et l'extension de la cellule végétale (Ridley *et al.*, 2001; Willats *et al.*, 2001).

La chaîne principale du rhamnogalacturonane I présente environ 100 répétitions du disaccharide (1→2)- $\alpha$ -L-rhamnose-(1→4)- $\alpha$ -D-acide galacturonique (Willats *et al.*, 2001). Ses chaînes latérales sont composées d'arabinose, galactose ou une combinaison de ces deux monosaccharides (Cosgrove, 1997). Les groupements carboxyliques de la chaîne principale du rhamnogalacturonane I peuvent être O-acétylé sur le carbone C2 et/ou C3 (Ridley *et al.*, 2001).

Le rhamnogalacturonane II est structurellement le plus complexe. Sa chaîne principale est composée de résidus acides D-galacturoniques liés en  $\alpha$  1→4 avec des chaînes secondaires pouvant être constituées de 12 types de sucres (Ridley *et al.*, 2001 ; Mohnen, 2008). Il est présent dans la paroi primaire en tant que dimère dont la liaison se fait par un ester 1, 2 borate diol. Ce lien est formé entre OH-2 et OH-3 des résidus apiosyles de chaque monomère de rhamnogalacturonane II (Ridley *et al.*, 2001).

L'homogalacturonane, un homopolymère linéaire d'acides D-galacturoniques liés en  $\alpha$  1→4, est le plus abondant des polysaccharides pectiques. Il contient environ 100 à 200 résidus. Parmi ces résidus, 70 à 80 % sont méthyl-estérifiés au niveau de la fonction carboxylique du C6 (Fig. 3A). L'homogalacturonane peut aussi être partiellement O-acétylé au niveau des carbones C2 ou C3 (Fig. 3A) (Ridley *et al.*, 2001). La perte des groupements méthyle ester dans la paroi végétale permet à l'homogalacturonane d'interagir avec le calcium pour former une conformation supra-moléculaire appelée « egg-box » (Willats *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 1982; Cosgrove, 1997).

La conformation en egg-box consiste en deux chaînes d'homogalacturonanes antiparallèles pontées par des ions calcium (Fig. 3B) (Morris *et al.*, 1982). Au moins 5 ions calcium sont estimés être requis pour l'alignement partiel de deux chaînes d'homogalacturonane. L'alignement total de ces deux chaînes se réalise progressivement pour obtenir une structure thermodynamiquement plus stable, il s'agit de la maturation des egg-box (Fig. 3C) (Cabrera *et al.*, 2008). La dimérisation des homogalacturonanes est fortement stabilisée par des liaisons de Van Der Waals et hydrogène en plus des interactions électrostatiques (Braccini and Perez, 2001).

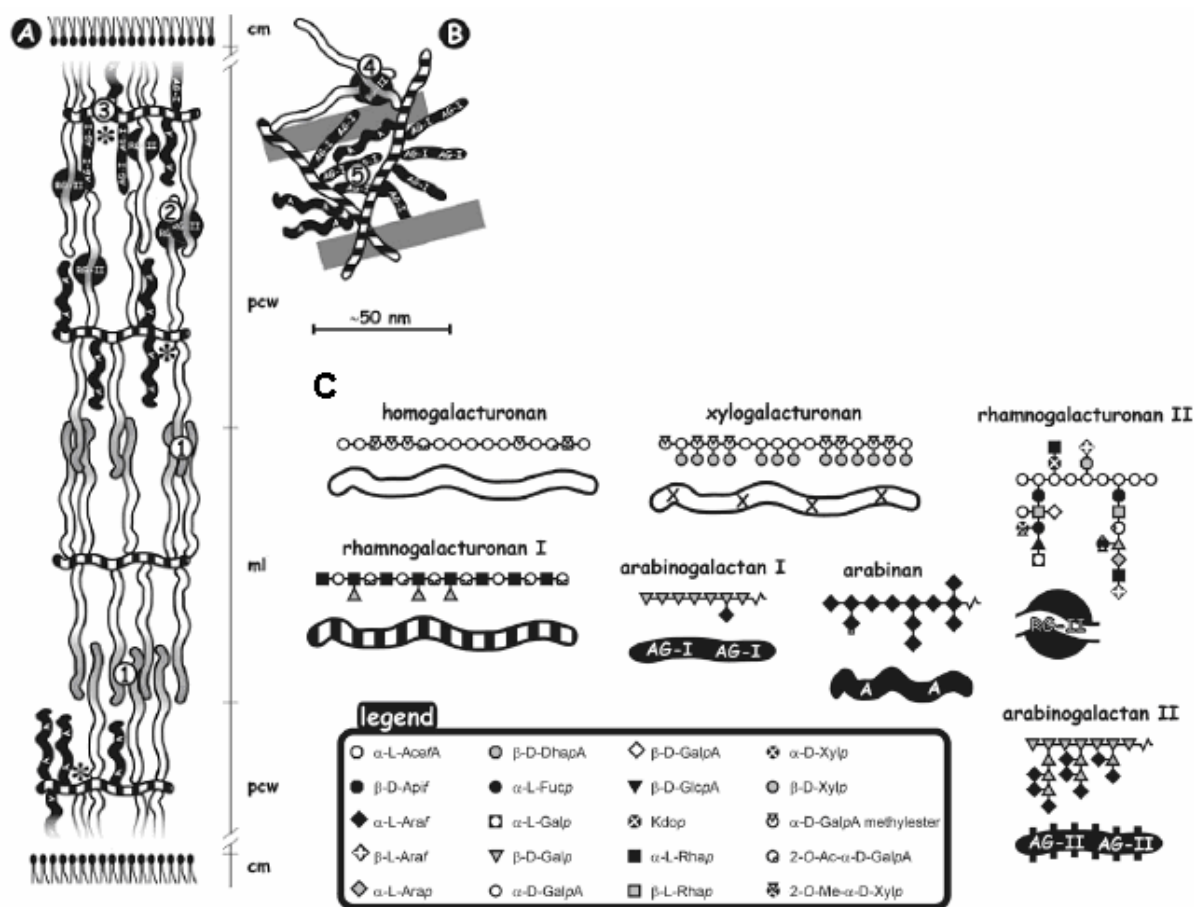


Figure 4. Modèle d'organisation du réseau pectique dans la lamelle moyenne et la paroi primaire végétale (Vincken *et al.*, 2003). **A :** vue latérale de parois primaires (pcw) séparées par la lamelle moyenne (ml) de 2 cellules voisines. 1, La lamelle mitoyenne est formée à partir de pectines, où les homogalacturonanes dans une conformation en egg-box, se déposent sous forme de couche disposée de façon opposée aux cellules voisines. 2, Le rhamnogalacturonane II se lie par couche successive de pectine par des esters borate diol. Plusieurs couches de pectines peuvent être insérées afin de former la paroi primaire. 3, La chaîne principale de rhamnogacturonane I est disposée contre des microfibrilles de cellulose. 4, Le rhamnogalacturonane II peut s'insérer entre deux couches de pectines, mais aussi dans la même couche de pectine. 5, Les arabinogalactanes et les arabinanes se placent dans les pores de la paroi végétale. **B :** cette structure est représentée vue du haut. **C :** légende des différents éléments présents dans le réseau pectique.

L'organisation du réseau pectique dans la lamelle moyenne et la paroi primaire végétale n'a pas été formellement établie. Cependant, il existe un modèle dans lequel les molécules de rhamnogalacturonanes I s'assembleraient parallèlement à la membrane plasmique contrairement aux homogalacturonanes qui seraient assemblés perpendiculairement (**Fig. 4**) (Vincken *et al.*, 2003).

## C. Rôle signalétique des pectines

En 1978, il a été démontré que des oligosaccharides d'origine fongique étaient capables d'induire la production de phytoalexines anti-microbiennes chez des plantes non infectées. Le terme d'oligosaccharine a été donné à toute molécule capable d'induire une réponse de défense (Albersheim and Valent, 1978). Des études sur la dégradation des polysaccharides pectiques par des pectinases microbiennes (pectinases, polygalacturonases, pectates lyases et pectines-estérases) ont montré que ces polysaccharides représentent une source d'oligosaccharides induisant des réponses de défenses chez les plantes (**Fig. 5**) (Esquerré-Tugayé *et al.*, 2000). Ces enzymes sont sécrétées par le pathogène assez rapidement après le début de l'infection pour dégrader la paroi végétale. Les oligosaccharides végétaux les plus étudiés sont les oligo- $\alpha$ -galacturonides (OGAs), molécules linéaires de 2 à 20 acides  $\alpha$ -1,4-D-galacturoniques, produits à partir de la dégradation d'homogalacturonanes (Ridley *et al.*, 2001).

Les réponses biologiques aux oligo- $\alpha$ -galacturonides (OGAs) diffèrent en fonction de leurs degré de polymérisation (Côté and Hahn, 1994). La majorité des OGAs, déclenchant des réponses cellulaires, possèdent un degré de polymérisation (DP) entre 10 et 16, ce qui coïncide avec la capacité d'adopter une conformation en egg-box (Côté and Hahn, 1994; Ridley *et al.*, 2001). Des OGAs avec un degré de polymérisation inférieur à 9 peuvent aussi engendrer certaines réponses biologiques (Ridley *et al.*, 2001). Les réponses biologiques aux OGAs peuvent être divisées en deux grandes catégories : les réponses de défense et les réponses dans le cadre de la croissance et du développement de la plante (Côté and Hahn, 1994).

### 1. Les réponses de défense

#### a. Les réponses de défense déclenchées par les OGAs de DP $\geq 9$

Lors d'une infection de la plante par un pathogène, les OGAs libérés peuvent être détectés par la plante afin d'initier des réponses de défenses. La plante peut limiter l'invasion du pathogène en renforçant la paroi végétale, en fermant les stomates, en synthétisant des phytoalexines, des protéines PR, en produisant des espèces réactives de l'oxygène et en entraînant la mort cellulaire localisée correspondant à la réponse hypersensible et dans certains cas entraîner la résistance systémique acquise dans le reste de la plante (Ridley *et al.*, 2001).

Comme nous allons l'aborder dans le point suivant, aucun récepteur aux OGAs n'a encore été clairement identifié. Cependant, beaucoup d'effets des OGAs sont connus. La réponse hypersensible est une réaction immédiate, localisée et antimicrobienne entraînant la mort programmée des cellules infectées afin d'empêcher la propagation du pathogène. La réponse hypersensible implique une série de phénomènes induits en partie par les OGAs tels que la production d'espèces actives de l'oxygène dont  $H_2O_2$  et  $O_2^{\cdot -}$  et la dépolarisation membranaire



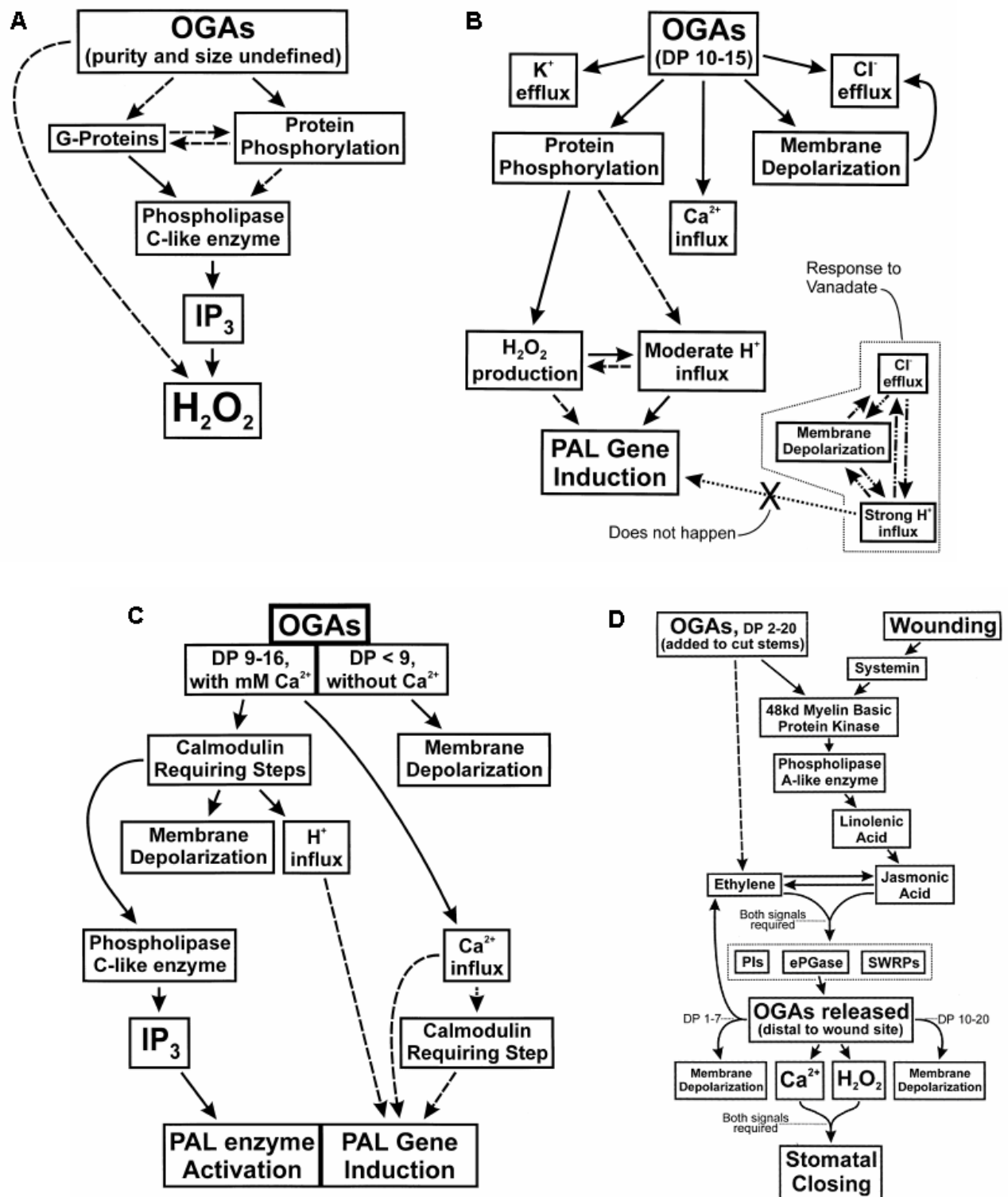


Figure 5. Modèle de signalisation des OGAs dans *A* : les plants de soja, *B* : les plants de tabac, *C* : les plants de carotte, *D* : les plants de tomate (Ridley *et al.*, 2001).

(Low and Merida, 1996; Côté and Hahn, 1994; Bolwell, 1999). Une étude sur des cellules en suspension de carottes avec des OGAs a montré que les OGAs induisaient un changement du potentiel membranaire via un efflux de potassium et un influx de calcium entraînant l'acidification du cytoplasme et l'alcalinisation du milieu extracellulaire (Messiaen and Van Custem, 1994). L'influx de calcium pourrait constituer un messenger secondaire qui permettrait l'augmentation de l'expression de l'ARNm et l'activité d'une polygalacturonase endogène. Cette enzyme dégrade la pectine afin de libérer des OGAs qui vont entraîner un stress oxydatif (Orozco-Cardenas and Ryan, 1999). Par ce biais, les OGAs induisent l'expression de peroxydases pariétales entraînant la production d'espèces réactives de l'oxygène qui favorisent la formation de liens entre les lignines, les protéines et les polysaccharides de la paroi cellulaire végétale et donc le renforcement de la paroi cellulaire (Côté and Hahn, 1994). De plus, les OGAs provoquent l'accumulation de lignine et de glycoprotéines riches en hydroxyproline (Boudart *et al.*, 1995).

Les OGAs augmentent l'expression d'inhibiteurs de protéases afin de ralentir la progression de l'agent pathogène et de réduire la source de carbone disponible pour ces derniers (Bishop *et al.*, 1984; Orozco-Cardenas *et al.*, 1993). L'agent pathogène peut être détruit par des molécules toxiques tels que les phytoalexines dont la production est entraînée par les OGAs via l'activation du gène codant la phenylalanine ammonia-lyase, première enzyme de la voie de signalisation des phenylpropanoïdes (Messiaen and Van Custem, 1994).

#### **b. Les réponses de défense déclenchées par les OGAs de $DP \leq 9$**

Les OGAs de petits degrés de polymérisation jouent aussi un rôle dans la réponse hypersensible. En effet, des OGAs de  $DP \leq 9$  entraînent l'expression de l'ARNm et l'activité d'un inhibiteur d'endopolygalacturonase. L'inhibiteur endopolygalacturonase prolonge la vie des OGAs dans l'apoplasme afin de ralentir la dégradation des pectines de la paroi cellulaire (Cervone Review of Ridley *et al.*, 2001). Des OGAs sont capables de protéger la plante contre *B. cinerea* en entraînant la résistance systémique acquise (Aziz *et al.*, 2007).

## **2. Les réponses se rapportant à la croissance et le développement végétale**

#### **a. Les réponses dans la croissance et le développement déclenchées par les OGAs de $DP \geq 9$**

Les OGAs influencent la croissance et le développement végétal en ayant un rôle opposé à celui de l'auxine. Les concentrations d'OGAs requises sont 10 à 100 fois inférieures à celles induisant des réponses de défenses (Côté and Hahn, 1994). Ils inhibent l'élongation de la tige de pin induite par l'auxine, la formation de racines et de stomates sur les explants foliaires de tabac (Branca, Tran Thanh Review of Ridley *et al.*, 2001).

#### **b. Les réponses dans la croissance et le développement déclenchées par les OGAs de $DP \leq 9$**

Les oligosaccharides sont aussi impliqués dans le mûrissement des fruits via la production d'éthylène. La biosynthèse de l'éthylène est augmentée par des OGAs suite à l'induction de l'expression de l'acide aminocyclopropane-1-carboxylique oxydase dans les plants de tomate (Simpson *et al.*, 1998).

## D. Les candidats récepteurs d'OGAs

En considérant les deux conformations possible des OGAs actifs et la gamme d'activités biologiques attribuée à ces OGAs, il est fort probable que les OGAs soient perçus par de multiples mécanismes de reconnaissance et de transduction du signal (Côté and Hahn, 1994; Spiro *et al.*, 1998).

Dans un premier temps, la paroi, elle-même, a été considérée comme un « récepteur » d'OGA. Les OGAs pourraient en effet s'insérer dans les différentes structures de la paroi afin de réduire la tension de la paroi. Ce changement de tension pourrait être transmis au cytosquelette et initier des cascades de signalisation via des protéines transmembranaires (Ridley *et al.*, 2001). Cette idée a été abandonnée au profit d'une perception par récepteurs.

Lors d'une étude sur les cellules de soja, il a été mis en évidence que celles-ci répondaient aux OGAs via un processus évoquant l'endocytose médiée par un récepteur. Des OGAs de DP 14, marqués radioactivement ou marqués à la fluorescéine isothiocyanate, étaient internalisés de façon spécifique vers la vacuole ou le tonoplaste. Comme pour l'endocytose médiée par un récepteur chez les cellules animales, cette internalisation nécessitait de l'énergie, était saturable et dépendait de la température. Aucun récepteur n'a été isolé dans le cadre de cette étude (Horn *et al.*, 1989).

Un candidat de récepteur d'OGA dénommé rémorine, une protéine membranaire de 34 kDa, est phosphorylée en réponse à des OGAs de DP entre 13 et 30. Une corrélation entre le degré de polymérisation et le taux de phosphorylation de la rémorine a été observée (Reymond *et al.*, 1995). La phosphorylation sur des résidus thréonine de la rémorine et la localisation de la rémorine phosphorylée à proximité de la membrane plasmique suggère qu'elle est phosphorylée par une protéine ser/thr kinase membranaire. Il semblerait que la rémorine soit associée au cytosquelette dans une superstructure multimérique intervenant dans la signalisation de la défense ou du développement (Reymond *et al.*, 1996). Actuellement, les études sur la rémorine sont principalement axées sur sa structure tridimensionnelle (Bariola *et al.*, 2004).

Actuellement, un candidat prometteur comme récepteurs aux OGAs est WAK1. WAK1 fait partie d'une famille de 5 récepteurs kinases transmembranaires associés à la paroi cellulaire. Cette sous famille de récepteurs appartient à la famille des récepteurs de types kinases (RLKs) que nous allons présenter dans le chapitre suivant. Nous aborderons plus en détails les interactions qui existent entre WAK1 et la pectine dans le chapitre réservé aux WAKs.

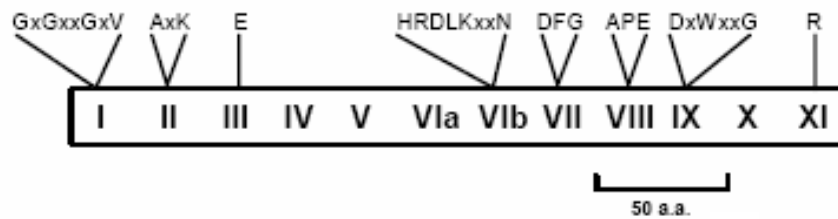


Figure 6. Schéma des 260 acides aminés typiques du domaine catalytique des kinases (Stone and Walker, 1995). Les 12 régions conservées sont annotées par des chiffres romains. Les séquences consensus de certaines régions sont présentes sur ce schéma.

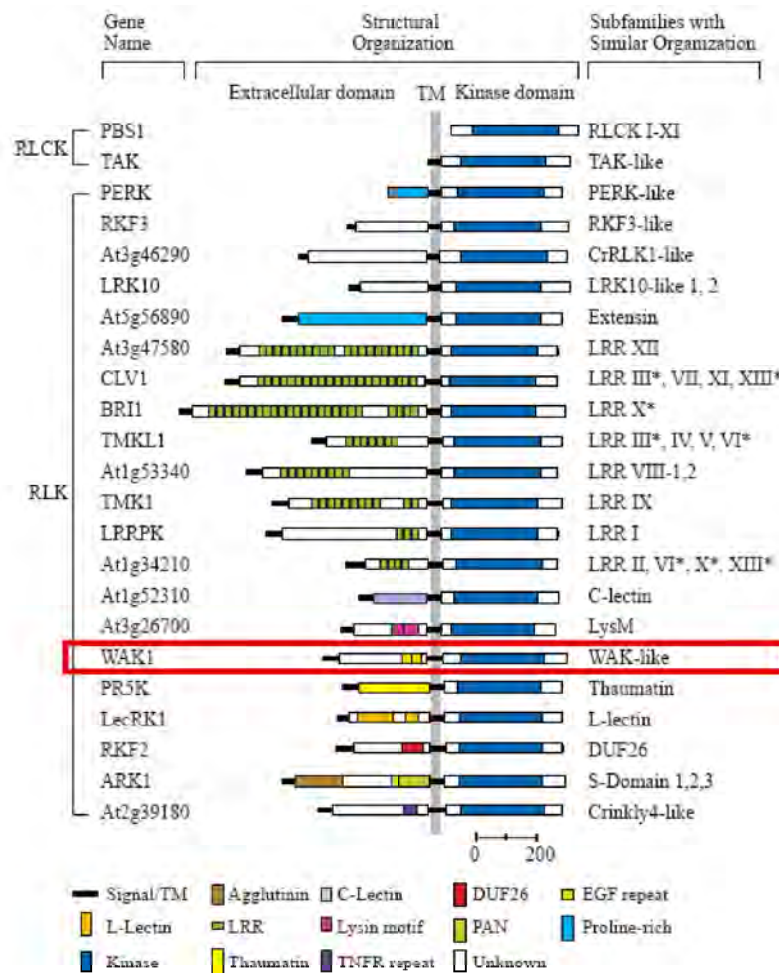


Figure 7. Représentation schématique des 21 sous-familles de RLK classées selon leur domaine extracellulaire (Shiu and Bleecker, 2001). Les WAKs et les WAKs-like constituent à eux seuls une sous-famille.

## II. Les récepteurs (like) kinases chez *Arabidopsis thaliana*

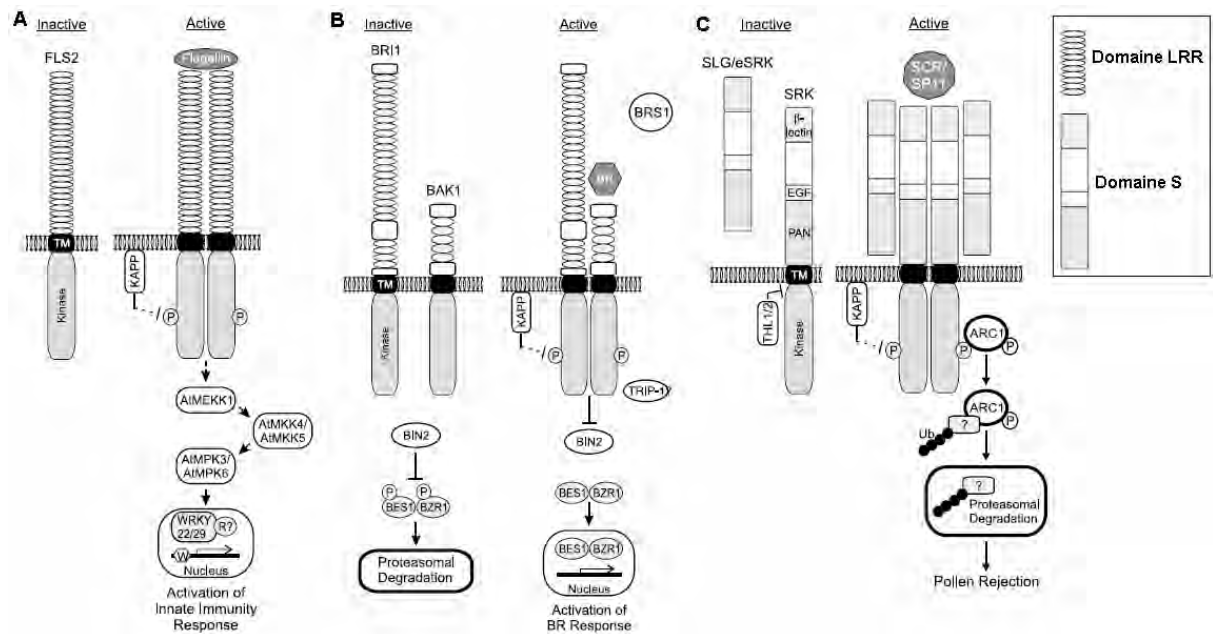
### A. Introduction

Tous les organismes vivants sont capables, afin de développer une réponse adaptée, de percevoir et de transmettre des informations du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire via, le plus souvent, des récepteurs kinases. Les protéines kinases sont des enzymes de conversion qui catalysent la phosphorylation de la fonction hydroxyle de certains résidus sérine, thréonine et/ou tyrosine de protéines cibles. La phosphorylation ajoute un groupement portant deux charges négatives, ce qui entraîne un changement de conformation modifiant la fonction de la protéine cible. Malgré la divergence de ces protéines d'un point de vue taille, structure et localisation, le domaine porteur de l'activité kinase, d'environ 260 acides aminés, contient 12 régions très bien conservées espacées par des régions moins bien conservées (Fig. 6) (Garrett *et al.*, 2000 ; Stone and Walker, 1995).

Les récepteurs kinases fonctionnent de façon prédominante en tant que régulateur des processus de développement et d'homéostasie. Chez les animaux, les récepteurs kinases phosphorylent majoritairement des résidus tyrosine. Chez les végétaux, même s'il existe aussi des tyrosines kinases, les récepteurs kinases phosphorylent plutôt des résidus sérine et thréonine. Ils jouent un rôle dans le développement, la perception d'hormones et dans la réponse aux pathogènes (Becraft, 2002).

Le séquençage complet du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis la prédiction de 610 récepteurs types kinases (RLK) (Shiu and Bleecker, 2001). Parmi ces 610 RLK, 417 présentent une organisation de domaines très similaire à celle des récepteurs tyrosine kinases animaux. En effet, la plupart ont une structure commune comprenant un domaine senseur extracellulaire relativement spécifique et peu conservé, un domaine transmembranaire et un domaine kinase de signalisation intracellulaire, qui lui, est généralement bien conservé. La diversité de domaines extracellulaires des RLKs végétaux a permis de les grouper en 21 sous-familles (Fig. 7). Les WAKs constituent à eux seuls une sous-famille (Shiu and Bleecker, 2001). Pour l'instant cette sous-famille, représentée par 26 gènes, comprend 5 WAKs et 21 WAK-Like (WAKL), ces derniers présentant des domaines WAKs tronqués (Verica and He, 2002; Shiu and Bleecker, 2001).

Même si quelques RLKs comme BRI1, Xa21, FSL2 et CLAVATA sont relativement bien caractérisés, la majorité des RLKs restent doublement orphelins, c'est-à-dire que ni le ligand extracellulaire, ni la première protéine interagissante de la voie de transduction du signal ne sont connus (Shiu and Bleecker, 2001).



**Figure 8.** Mode de fonctionnement des récepteurs FLS2, BRI1 et SRK (Haffani *et al.*, 2004). **A** : FLS2 est un récepteur à domaine LRR. Il s'homodimérise en présence de flagelline pour initier une cascade de MAPK menant à des réponses de défense. **B** : BRI1 est un récepteur à domaine LRR. Il s'hétérodimérise avec BAK1 en présence de brassinostéroïdes. **C** : le récepteur SRK contient un domaine S. Il s'homodimérise pour entraîner une réponse d'auto-incompatibilité permettant d'empêcher une auto-fertilisation de la plante.

## B. Présentation de quelques classes de RLK

### 1. Les récepteurs kinases à domaine LRR

Les récepteurs kinases à domaine LRR représentent la moitié des récepteurs kinases prédits chez *Arabidopsis thaliana*. Les répétitions riches en leucine permettent des interactions de type protéine-protéine pour lesquels les résidus non conservés constitueraient la spécificité de ces interactions (Haffani *et al.*, 2004). Un motif répété comprend 24 acides aminés. Il existe 8 organisations différentes de ces domaines variant en fonction du nombre et de l'agencement des répétitions. Les motifs répétés peuvent être groupés en cluster ou arrangés en plusieurs blocs. Le nombre de répétitions varie entre 3 et 27. Cependant, la majorité possède 3, 6, 12 ou 23 copies suggérant une évolution par duplication de motif (Zhang, 1998; Shiu and Bleecker, 2001).

Le récepteur de la flagelline (FSL2) contient 28 répétitions riches en leucine au niveau de son domaine extracellulaire. Il reconnaît la flagelline, une protéine du flagelle bactérien, afin d'entraîner une réponse contre une attaque bactérienne (Chinchilla *et al.*, 2006). Cette reconnaissance entraîne sa dimérisation, son auto-phosphorylation et l'initiation d'une cascade de MAPK menant à la production des facteurs de transcription WRKY médiant la réponse de défense (Fig. 8A) (Haffani *et al.*, 2004).

Le récepteur aux brassinostéroïdes BRI1 contient 25 répétitions riches en leucine, une région distincte de 70 acides aminés entre les répétitions 21 et 22 et un motif leucine zipper dans son domaine extracellulaire. Il est impliqué dans plusieurs réponses aux brassinostéroïdes telle que la promotion de l'élongation cellulaire (Wang *et al.*, 2001; Müssig *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2005). La liaison de brassinostéroïdes induit un changement de conformation du récepteur BRI1 menant à la phosphorylation de résidus dans son domaine C-terminal. Suivant le niveau de phosphorylation et l'état d'activation de BRI1, celui-ci s'hétérodimérise avec BAK1 pour former un complexe multimérique via leurs domaines intracellulaires et ainsi initier la transduction du signal (Wang *et al.*, 2005). En effet, ce complexe actif induit la dégradation par le protéasome de la kinase BIN2, un régulateur négatif de la voie de signalisation des brassinostéroïdes (Fig. 8B) (Nam and Li, 2002).

### 2. Les récepteurs de domaines S et les récepteurs de répétitions riches en cystéines

Les récepteurs kinases à domaine S comprennent 40 membres chez *Arabidopsis thaliana*. L'homologie entre ce motif et la glycoprotéine du locus S, lui a donné le nom de domaine S. Ce domaine est riche en cystéine et contient une répétition EGF (Haffani *et al.*, 2004).

Le récepteur kinase S (SRK) de *Brassica* contient un domaine S riche en cystéines qui comprend des motifs EGF, agglutinine et PAN dans sa région extracellulaire (Fig. 8C) (Shiu and Bleecker, 2001). Le motif agglutinine est capable de lier l' $\alpha$ -mannose et le motif PAN, de structure en hair pin, est impliqué dans les interactions protéine-protéine et dans les interactions protéine-carbohydre. La protéine SRK dimérise avec eSRK, une protéine ne contenant que le domaine extracellulaire S homologue à celui de SRK. Le récepteur SRK est

impliqué dans l'interaction pistil-pollen en empêchant l'auto-fertilisation. Lors d'une pollinisation incompatible, SRK, localisée au niveau du stigmate, reconnaît la protéine 11 du locus *S* (SP11) ou SCR présente à la surface du grain de pollen afin d'entraîner la destruction du grain de pollen provenant du soi (Haffani *et al.*, 2004).

### 3. Les récepteurs kinases riches en prolines (PERK)

Les récepteurs PERK sont riches en prolines et présentent une homologie de séquence avec les extensines. Ils ont comme particularité de ne pas posséder de peptide signal malgré leur présence dans la membrane plasmique (Haffani *et al.*, 2004). La sous-famille PERK comprend 15 membres chez *Arabidopsis thaliana*. Le mode de fonctionnement de ces récepteurs n'a pas encore été déterminé (Humphrey *et al.*, 2007).

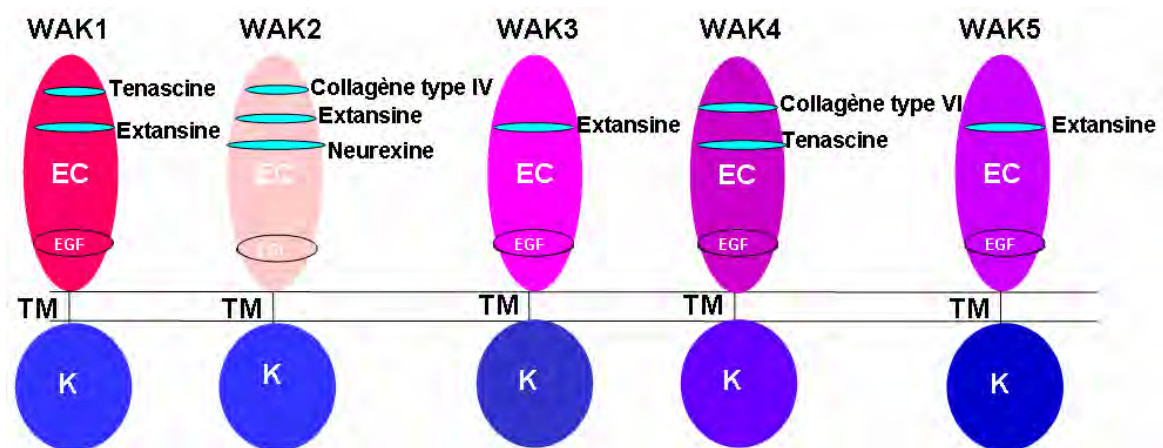
Chez *Brassica napus*, lors d'une blessure ou lors d'une attaque d'un pathogène fongique tel que *Sclerotinia sclerotiorum*, l'expression de l'ARNm de PERK1 est fortement augmentée. L'infection de la plante par ce pathogène pourrait entraîner des modifications chimiques et physiques de la paroi cellulaire végétale suite à sa pénétration. Le récepteur PERK1 est supposé être un senseur des perturbations de la paroi végétale (Silva and Goring, 2002). Chez *Arabidopsis thaliana*, une surexpression de *PERK1* entraîne une augmentation du nombre de branches latérales, la croissance des racines et la production de graines. Par contre, lorsque PERK1 est supprimé par son ARN antisens, les plantes deviennent chétives et la croissance de leurs racines est altérée (Haffani *et al.*, 2004).

### 4. Les récepteurs CrRLK1

La sous-famille des récepteurs kinases *Catharanthus roseus* (CrRLK1) comprend 17 membres chez *Arabidopsis thaliana* et 20 membres chez le riz (Shiu and Bleecker, 2001; Hématy and Höfte, 2008). Les CrRLKs possèdent un domaine extracellulaire n'ayant aucune similarité de séquence avec des domaines de protéines connues (Shiu and Bleecker, 2001). Une analyse phylogénétique permet de subdiviser la sous-famille CrRLK1 en 6 sous-classes (Hématy and Höfte, 2008).

Le récepteur THESEUS fait partie de cette sous-famille de récepteurs. Il inhibe l'expansion cellulaire lors de perturbations dans la synthèse de cellulose (Hématy *et al.*, 2007). Une inhibition de la synthèse de cellulose entraîne une inhibition de la croissance, une accumulation de lignine et des changements dans la composition des polysaccharides de la paroi cellulaire végétale. THESEUS inhibe la croissance de l'hypocotyle et entraîne l'accumulation de lignine ectopique. De part sa localisation dans la membrane plasmique et le fait qu'il peut être phosphorylé sont deux caractéristiques faisant de lui un nouveau candidat à la perception de l'intégrité de la paroi (Hématy and Höfte, 2008). En effet, le facteur qui active le récepteur THESEUS pourrait être un changement dans la composition de la paroi ou la libération de fragments particuliers de la paroi. Une analyse microarray a identifié 36 gènes régulés par THESEUS dont 30 sont régulés positivement et 6 sont régulés négativement. Les gènes surexprimés codent pour des protéines ayant un rôle dans la protection contre les espèces réactives de l'oxygène, ayant un rôle dans la défense, et pour des protéines de la paroi cellulaire végétale telle que les protéines riches en glycine. Parmi ces protéines riches en glycine, AtGRP3, est capable d'interagir avec WAK1, un récepteur kinase associé à la paroi végétale pouvant jouer un rôle dans la signalisation entre la paroi et le cytoplasme. Il a été proposé que les voies de signalisation de THESEUS et de WAK1 soient connectées à travers ces protéines (Hématy *et al.*, 2007). En dehors de son rôle lors d'une déficience dans la





**Figure 9. Représentation schématique des protéines WAKs et de leurs différentes zones d'homologie avec des domaines de protéines de la matrice extracellulaire des animaux (Tenascine, Extansine, Neurexine, Collagène de type IV et VI). Les domaines extracellulaires sont peu conservés entre WAKs contrairement au domaine kinase cytoplasmique bien conservé. EC : domaine extracellulaire; EGF : 2 domaines EGF; K : domaine sérine/thréonine kinase; TM : domaine transmembranaire.**

synthèse de la cellulose, la surexpression de ces gènes montre qu'il serait aussi impliqué dans d'autres perturbations de la paroi se produisant lors de stress abiotiques ou lors d'une attaque pathogène. Cependant, son mode de fonctionnement et son ligand n'ont pas encore été découverts (Hématy and Höfte, 2008).

## C. Les WAKs : Wall-Associated Kinases

### 1. Introduction

Le récepteur kinase, WAK1, fut initialement nommé PRO25 par Kohorn et ses collaborateurs en 1992 (Kohorn *et al.*, 1992). PRO25 a été identifiée comme faux-positif lors d'un criblage double hybride visant à identifier une protéine interagente de LHCP, une protéine intégrée à la membrane thylakoïde du chloroplaste liant la chlorophylle a/b (Kohorn *et al.*, 1992). Comme PRO25 s'est révélé être un récepteur kinase associé à la paroi, il a été renommé Wall-associated kinase (WAK1). Dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, 5 gènes homologues à WAK1 ont été découverts et nommés WAK1-5. Ces 5 gènes sont disposés sur un cluster de 30 Kb sur le chromosome 1 (He *et al.*, 1999). Cette famille a été étendue à 26 gènes avec la découverte des 21 WAKs like (Verica and He, 2002).

### 2. Structure des WAKs

Les WAKs possèdent un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine sérine-thréonine kinase cytoplasmique typique d'un RLK (Fig. 9) (He *et al.*, 1999).

Le domaine extracellulaire des WAKs est faiblement conservé entre les isoformes (de 40 à 64 % d'identité) malgré la présence de deux domaines EGF, motifs connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine chez les cellules animales (He *et al.*, 1999; Kohorn *et al.*, 2001). Les domaines EGF possèdent 6 cystéines espacées qui forment des ponts disulfures. Chaque WAK contient deux domaines EGF différents. En effet, l'un lie le calcium (EGF-Ca<sup>2+</sup>) et l'autre non (EGF2) (Kohorn, 2001).

Les domaines extracellulaires des isoformes WAKs contiennent, en plus des domaines EGFs, des régions homologues à des protéines présentes dans la matrice extracellulaire des animaux telles que la neurexine, la tenascine, le collagène de type IV et VI. Ainsi, les acides aminés 43-95 de WAK2 présentent une identité limitée à 52 acides aminés du collagène de type IV. Les résidus 124-169 de WAK4 présentent une homologie avec les résidus 213-258 du collagène de type VI. WAK2 contient une séquence semblable à la neurexine; et WAK4, avec la tenascine. Ces deux familles de protéines jouent un rôle dans la matrice extracellulaire des animaux pluricellulaires. Il est possible que ces régions d'homologie soient impliquées dans des interactions protéines-protéines et/ou dans l'oligomérisation de récepteurs kinases associés à la paroi végétale (He *et al.*, 1999).

Le domaine sérine/thréonine kinase cytoplasmique et ses 12 régions caractéristiques des WAKs sont très bien conservés (86 % d'identité) (He *et al.*, 1999).

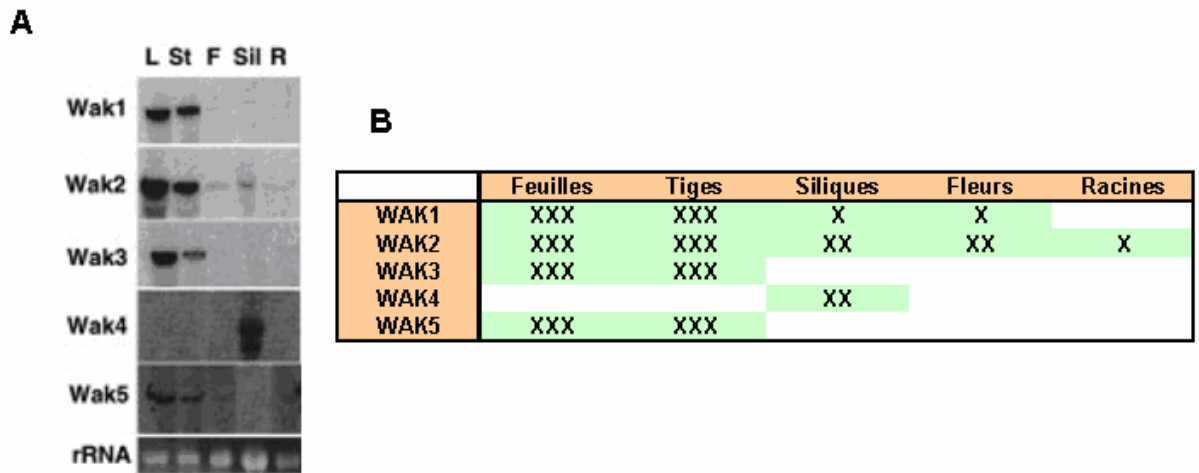


Figure 10. *A* : Northern blot montrant l'expression des 5 gènes *WAK* dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* (He *et al.*, 1999). Chaque piste contient respectivement 20 µg d'ARN totaux de feuilles (L), tiges (St), fleurs (F), siliques (Sil) et de racines (R). *B* : Tableau récapitulatif de l'expression des *WAKs* dans les différents tissus d'*Arabidopsis thaliana*. Les ARNm de *WAK1*, *WAK3* et *WAK5* sont principalement exprimés dans les feuilles et les tiges d'*Arabidopsis thaliana*. Les ARNm de *WAK2* sont trouvés à des niveaux élevés (XXX) dans les feuilles et les tiges, à des niveaux plus faibles (XX) dans les fleurs et les siliques et à des quantités traces (X) dans les racines. Les ARNm de *WAK4* sont seulement détectés dans les siliques.

### 3. Expression et localisation des WAKs

Les récepteurs WAKs sont principalement exprimés au niveau de tous les organes verts, contrairement au WAKLs qui sont principalement exprimés au niveau des racines et des feuilles (He *et al.*, 1999; Verica and He, 2002). En effet, une analyse Northern blot avec des sondes spécifiques a révélé que *WAK1*, *WAK3* et *WAK5* sont principalement exprimés dans les feuilles et les tiges d'*Arabidopsis thaliana* alors que ceux de *WAK4* le sont seulement dans les siliques (He *et al.*, 1999). Cependant, une analyse RT-PCR plus sensible a montré des transcrits de *WAK4* dans tous les organes de la plante (Lally *et al.*, 2001). Les ARNm de *WAK2* sont essentiellement présents dans les feuilles et les tiges, et dans une moindre mesure dans les fleurs, les siliques et les racines (Fig. 10 A et B) (He *et al.*, 1999). La localisation et le niveau d'expression des WAKs peuvent cependant être modulés par divers facteurs tels que l'attaque par un pathogène, la croissance cellulaire et la présence d'aluminium (Sivaguru *et al.*, 2003).

L'étude de l'expression spatio-temporelle des WAKs a montré qu'ils étaient présents dès le début du développement de plantules. Pour cette étude, chacun de leur promoteur a été fusionné avec le gène codant pour la  $\beta$ -glucuronidase (GUS). *WAK1*, *WAK2* et *WAK3* présentent des profils d'expression distincts mais avec des chevauchements entre eux. L'expression de *WAK1* et de *WAK2* est ainsi détectée au premier stade de développement de la plante dans les jonctions d'organes, dans le méristème apical de la tige et dans le méristème apical de la racine. Cependant, le timing d'expression entre *WAK1* et *WAK2* diffère puisque l'expression de *WAK1* est plus précoce que *WAK2* dans les cotylédons au début de leur développement. L'inverse est observé à la base des fleurs. *WAK3* est, quant à lui, exprimé au niveau des cotylédons, des feuilles et des tiges de façon sporadique (Wagner and Kohorn, 2001).

### 4. Rôle des WAKs

#### a. Rôle des WAKs dans la croissance et le développement

La croissance végétale est accomplie à travers une division cellulaire ordonnée et une expansion cellulaire fortement régulée. L'élongation cellulaire, possible grâce au relâchement de la paroi et à la pression de turgescence, est un processus régulé par des stimuli externes (lumière, eau) et des stimuli internes tels que les phytohormones qui sont d'une importance critique pour la croissance de végétaux (Azpiroz *et al.*, 1998; Pritchard, 1994).

La suppression des transcrits des WAKs par des ARN antisens entraîne une diminution de l'expansion cellulaire sans pour autant perturber les divisions cellulaires (Wagner and Kohorn, 2001). L'expression de l'ARN antisens de *WAK4* réduit efficacement la quantité de protéines de tous les isoformes WAKs. Cette suppression des WAKs engendre donc des effets pléiotropes dramatiques sur la croissance et le développement d'*Arabidopsis thaliana*, suggérant que la présence des WAKs s'avère être indispensable au développement de la plante. Ces effets sont observés à différentes étapes du développement incluant le début du développement de la plantule, le développement de l'inflorescence, le développement de leurs et la formation des graines (Lally *et al.*, 2001).

Par ailleurs, une mutation dans le gène de *WAK2* réduit l'expression et l'activité d'une invertase vacuolaire, un facteur clé dans la turgescence et l'expansion cellulaire. *WAK2*

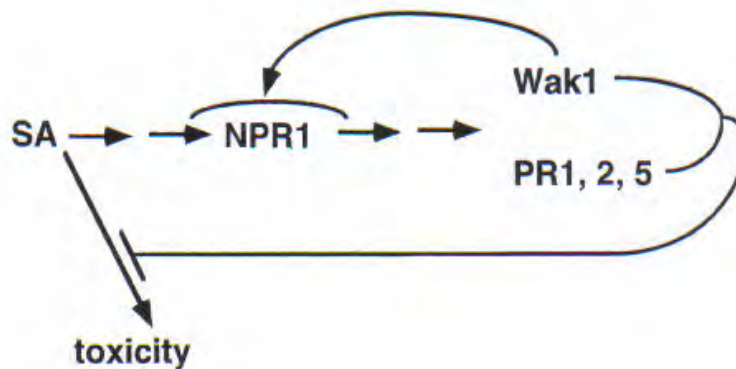
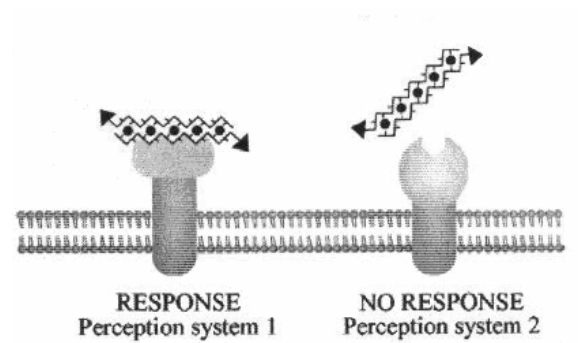


Figure 11. Modèle de régulation de WAK1 lors de la réponse contre un pathogène (He *et al.*, 1998). L'acide salicilique entraîne l'activation du régulateur positif NPR1, requis pour l'expression de *PR1*, *PR2*, *PR5* et *WAK1*. *PR1*, *PR2*, *PR5* et *WAK1* peuvent inhiber l'effet toxique de l'acide salicilique. SA : acide salicilique; PR : protéines se rapportant à la pathogénèse; NPR1 : non expresseur des gènes PR.

pourraient, par conséquent, jouer un rôle dans le maintien de la turgescence lors de la croissance cellulaire (Kohorn *et al.*, 2006).

#### **b. Rôle des WAKs dans la défense contre les pathogènes**

Un grand nombre d'interactions entre l'agent envahisseur et la matrice extracellulaire peut être signalée de la matrice extracellulaire (MEC) vers le cytoplasme. L'infection par un pathogène est souvent accompagnée d'une réponse hypersensible et d'une mort cellulaire localisée et, même dans certains cas, d'une résistance systémique acquise (SAR). Ces deux réponses sont associées à des augmentations du niveau d'acide salicilique (SA), à un stress oxydatif et à l'induction de protéines se rapportant à la pathogenèse (Baker *et al.*, 1997). L'expression de l'ARNm de *WAK1*, *WAK2*, *WAK3* et *WAK5* est aussi induite par SA et son analogue l'acide 2,2-dichloroisonicotinique (INA) (He *et al.*, 1999). L'acide salicilique mène à l'activation de NPR1, un facteur de transcription, en entraînant la réduction de 2 de ses cystéines et en stimulant la transition entre sa forme oligomérique et monomérique. La forme monomérique réduite de NPR1 est alors transloquée du cytosol vers le noyau où il active l'expression des gènes codant pour les protéines PR1, PR2 et PR5 sur une période de 3 jours (Blanco *et al.*, 2005; He *et al.*, 1998). L'expression de *WAK1* est affectée par une mutation dans le gène *NPR1*, ce qui suggère que l'expression de *WAK1* serait probablement induite par un mécanisme similaire à celui des gènes codant pour PR1, PR2 et PR5 (Fig. 11). De plus, *WAK1* est capable de moduler les effets de l'acide salicilique en modifiant l'expression des gènes codant pour les protéines PR en agissant sur NPR1 ou sur une étape de sa voie de transduction du signal (He *et al.*, 1998). Cette induction de l'expression de *WAK1* est en réalité requise pour la survie de la plante lors d'une attaque par un pathogène (Anderson *et al.*, 2001).



**Figure 12.** Systèmes de perception des dimères d'OGAs dans une conformation en egg-box par un récepteur membranaire putatif (Cabrera *et al.*, 2008). Le système de perception reconnaît spécifiquement les jonctions egg-box. WAK1 reconnaîtrait les OGAs suivant ce système de perception.

## 5. WAKs et signalisation

Le domaine extracellulaire de WAK1 interagit avec les pectines et AtGRP3. Le domaine intracellulaire de WAK1 quant à lui interagit avec OEE2.

### a. WAK1 : un bon candidat de récepteur aux OGAs

Des études par digestions enzymatiques de la paroi végétale ont permis de conclure que les WAKs étaient liés à la pectine puisque seule le traitement à la pectinase libérait les WAKs de la paroi. Les WAKs ainsi libérés étaient encore liés à la pectine (Wagner and Kohorn, 2001). Cependant, le type de liaison entre WAKs et pectines n'est pas déterminé. Pour Wagner et Kohorn, la libération des WAKs lié à la pectine suite à un traitement à la pectinase suggère la présence d'une liaison covalente entre les WAKs et la pectine (Wagner and Kohorn, 2001). Pour Decreux et ses collaborateurs, une liaison non covalente n'est pas nécessairement en contradiction avec les résultats d'extraction des WAKs. En effet, les traitements à la pectinase dépolymérisant les pectines dans la paroi cellulaire, les WAKs pourraient être extrait en liaison avec des oligosaccharides de  $DP \geq 9$  (Decreux *et al.*, 2005).

Des études d'interaction *in vitro* ont confirmé l'interaction entre la pectine de degré de polymérisation  $\geq 9$  en conformation egg-box et WAK1 (Decreux *et al.*, 2005; Decreux *et al.*, 2006). Pour caractériser cette interaction, la séquence correspondant aux acides aminés 67-254, domaine spécifique du domaine extracellulaire de WAK1, a été surexprimée en levure. Des tests d'interaction *in vitro* ont permis de montrer que, dans des conditions favorisant la formation d'egg-box, WAK1<sub>67-254</sub> était capable de lier l'acide polygalacturonique (PGA), les oligogalacturonides (OGAs) et les pectines extraites de plantules d'*Arabidopsis thaliana*. Cependant, WAK1<sub>67-254</sub> ne se lie pas à des pectines méthylestérifiées à 65 ou 90 %, suggérant ainsi que les charges négatives des pectines sont d'une façon ou d'une autre impliquées dans l'assemblage du complexe PGA-WAK1<sub>67-254</sub> (Decreux *et al.*, 2005). Une analyse de cluster hydrophobe *in silico* a permis de prédire quatre sites de liaisons aux pectines dans le domaine extracellulaire de WAK1. Ces sites ont été évalués par mutagenèse dirigée, ce qui a permis d'identifier cinq acides aminés basiques [R67, R91, K101, K102 et R166] impliqués dans l'interaction de PGAs et de WAK1<sub>67-254</sub> (Decreux *et al.*, 2006). Des tests d'interaction au court du temps entre WAK1<sub>67-254</sub> et les OGAs montrent une relation directe entre la maturation des egg-box et la liaison à WAK1<sub>67-254</sub> (Cabrera *et al.*, 2008).

L'alcalinisation extracellulaire et la production de peroxyde d'hydrogène sont deux réponses cellulaires induites par les OGAs. Lorsque l'extrémité réductrice des OGAs est modifiée par biotinylation, réduction ou oxydation, l'activité des OGAs diminue fortement (Spiro *et al.*, 1998; Cabrera *et al.*, 2008). Une modification de l'extrémité réductrice des OGAs n'affecte cependant pas la liaison de WAK<sub>67-254</sub> aux egg-box, suggérant que WAK1 reconnaît des zones de jonction de la pectine (Fig. 12). A côté de ce premier type de récepteur, un deuxième système de perception coexisterait et reconnaîtrait plutôt les extrémités des egg-box. Ce deuxième senseur contrôlerait l'alcalinisation extracellulaire et la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cabrera *et al.*, 2008).



### **b. Interaction entre le domaine extracellulaire de WAK1 avec AtGRP3/KAPP**

Un criblage double hybride du domaine extracellulaire de WAK1 contre une banque d'ADNc de plantules d'*Arabidopsis thaliana* a mis en évidence une interaction entre WAK1 et une protéine extracellulaire riche en glycine, AtGRP3. Cette interaction a été vérifiée *in vitro* par GST-Pull Down Assay (Park *et al.*, 2001). Parmi les 6 isoformes d'AtGRP et les 5 isoformes WAKs testées, seule AtGRP3 interagit avec le domaine extracellulaire de WAK1, 3 et 5. L'extrémité C-terminale riche en cystéines de AtGRP3 est essentielle dans l'interaction avec le domaine extracellulaire de WAK1. L'implication des résidus cystéines conservés de WAK1 dans l'interaction avec AtGRP3 n'a pas été évaluée (Park *et al.*, 2001).

KAPP, une phosphatase de type 2C, jouant un rôle de régulateur négatif de nombreux récepteurs kinases tel CLAVATA 1, a également été identifiée par immunoprécipitation et western blot comme étant associée au complexe WAK1-AtGRP3. Le complexe WAK1/AtGRP3/KAPP pourrait jouer un rôle dans la défense lors d'une attaque pathogène (Park *et al.*, 2001).

### **c. Interaction entre le domaine intracellulaire de WAK1 et OEE2**

En voulant identifier, par une électrophorèse de gel à deux dimensions, les molécules impliquées dans la signalisation AtGRP3/WAK1 une protéine chloroplastique dénommée OEE2 (oxygen evolving enhancer protein 2) a été identifiée. Cette dernière interagit avec le domaine intracellulaire de WAK1 et est phosphorylée d'une façon AtGRP3 dépendante. Cette interaction a été confirmée par test double hybride en levures et par GST Pull Down Assay. La protéine OEE2 et deux autres protéines forment un complexe qui aide le photosystème II à oxyder des molécules d'eau afin de produire des molécules d'oxygène. Comme l'oxygène agit en tant qu'accepteur d'électron pendant la photosynthèse, OEE2 phosphorylé pourrait moduler la formation de  $H_2O_2/O_2^-$  résultant de la réduction de l'oxygène en réponse à AtGRP3/WAK1 (Yang *et al.*, 2003).

### III. Objectifs

Les récepteurs WAKs jouent un rôle important dans la défense contre un pathogène, la croissance et le développement cellulaire d'*Arabidopsis thaliana*. Depuis quelques années, notre laboratoire cherche à caractériser l'interaction de la pectine avec WAK1 dont le mode de fonctionnement est encore inconnu. Comme nous l'avons exposé lors de l'introduction, les RLKs, actuellement caractérisés, doivent hétéro- ou homodimériser pour déclencher une voie de transduction du signal.

Lors de ce mémoire, nous avons donc opté pour une étude avec *a priori* des interactions protéine-protéine des WAKs, et plus particulièrement entre leurs domaines extracellulaires.

Le premier objectif de ce mémoire est donc de cloner, en bactérie puis en levure, les séquences cDNA codant pour les domaines extracellulaires des WAKs, et plus particulièrement de WAK1 et WAK2. Nous nous focaliserons sur l'interaction présumée entre domaines extracellulaires entiers (peptide signal exclu) afin de mettre en évidence une possibilité d'homo ou d'hétérodimérisation. La définition de la région exacte éventuellement impliquée dans l'interaction protéine-protéine par réductions successives des zones de cDNA clonés constitue un objectif futur.

Le deuxième et principal objectif est de tester par double-hybride avec appât et proie connus (WAKs), si les WAKs peuvent interagir, suggérant une homo ou hétérodimérisation. Les clones levuriens présentant des interactions inter- et intra-WAK seront sélectionnés positivement, négativement et par tests colorimétriques grâce à des gènes rapporteurs multiples.

En cas d'identification d'interactions, des tests GST-Pull Down seront effectués *in vitro*. Pour ce faire, les protéines WAKs fusionnées à des tags seront transcrites et traduites *in vitro* avant de tester leur interaction sur des billes magnétiques liant la GST. La révélation des protéines impliquées dans l'interaction se fera par western blot grâce à des lysines biotinylées insérées lors de l'étape de traduction *in vitro* des protéines.

# **Matériel et Méthodes**

Alanine	A	Lysine	K
Arginine	R	Méthionine	M
Acide aspartique	D	Phénylalanine	F
Asparagine	N	Proline	P
Cystéine	C	Sérine	S
Acide glutamique	E	Thréonine	T
Glutamine	Q	Tyrosine	Y
Glycine	G	Valine	V
Isoleucine	I		

**Tableau 1. Code en une lettre des acides aminés utilisés pour le milieu sélectif de levure.**

Rem : les quatre acides aminés qui serviront pour la sélection des levures seront ajoutés en fonction du milieu à réaliser (tryptophane, histidine, leucine, et uracile).

# I. Souches utilisées

## A. Bactéries : *E. coli* TOP10F'

*F'*[*lacI<sup>f</sup>* *Tn10(tet<sup>R</sup>)*] *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*  $\Delta$ *lacX74* *deoR* *nupG* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL(Str<sup>R</sup>)* *endA1*  $\lambda^-$

## B. Levures *MaV103*

MATa, [*ade2-1 leu2-3 112 trp-901 his3* $\Delta$ 200  $\Delta$  *ura3-52 gal4* $\Delta$  *gal80* $\Delta$  *SPAL10::URA3* *GAL1::lacZ* *Gall::HIS3* *LYS2* *can1R* *cyh2R*] (Walhout et al. 2001)

## C. *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia (A-TL) (Col-0 N1092)

# II. Milieux de croissance

## A. Milieux pour bactéries

### Milieu SOC (1L):

- 2% Bactotryptone (Remel),
- 0,5% Extracted from yeast (Remel),
- 10 mM NaCl (VWR),
- 2,5 mM KCl (VWR),
- 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Pro analys, Merck),
- 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Vel), ajouter 1L d'eau désionisée et ajuster le pH à 7.
- Ajouter 20 mM de Glucose (Riedel-de Haën) stérile (filtré sur stéricup 0,22  $\mu$ m (Millipore) juste après autoclavage.

### Milieu LB (1L):

- 20 g/L de LB (BD).
- Ajouter 15 g d'agar (Fluka) pour un milieu solide.
- Autoclaver.

## B. Milieux pour levures

### Préparation stock d'acides aminés pour milieux de cultures (sans -Leu, -Trp, -His, -Ura):

- Mélanger 1g de chacun des acides aminés suivant : A, R, D, N, C, E, Q, G, I, K, M, F, P, S, T, Y, et V (**Voir tableau 1**).
- Ajouter 1g d'adénine sulfate.

### Préparation d'1 L de milieu riche non sélectif:

- Mélanger 10g d'extrait de levure (Remel) et 20g de Bacto-peptone (Remel) avec 950 ml d'eau.
- Ajouter 20 g d'agar (Fluka) pour un milieu solide.
- Autoclaver et ajouter 50 ml de glucose (Riedel-de-Haën) 40% stérile (filtré sur stéricup 0,22  $\mu$ m (Millipore) avant utilisation.

#### Préparation d'1 litre de milieu complet synthétique:

- Mélanger 1,3g du stock d'acides aminés (-Trp, -His, -Leu, -Ura) et 6,7g de base azotée contenant du sulfate d'ammonium (YNB) (BD).
- Ajouter 20 g d'agar (Fluka) pour un milieu solide.
- Porter à volume avec de l'eau désionisée et ajuster le pH à 5,9 avec du NaOH 10M et autoclaver.
- Ajouter 50 ml de glucose (Riedel-de-Haën) 40 % (filtré sur stéricup 0,22 µm (Millipore) avant utilisation ainsi que des acides aminés adéquats selon le milieu sélectif souhaité (100 mM Histidine, 20 mM Uracile, 100 Mm Leucine, 40 mM Tryptophane) (Walhout *et al.*, 2001).

## **C. Milieu pour plantules d'*Arabidopsis thaliana***

#### Milieu MSMO (1L):

- 4,302 g de milieu Murashige et Skoog (Duchefa biochemie).
- 30 g de sucrose (Riedel-de-Haën).
- Mettre à pH 5,8 et autoclaver.

## **III. Liste de Kits utilisés**

- **Extraction d'ARN de plantules d'*Arabidopsis thaliana*:** Tripure (Roche).
- **Rétro-transcription:** Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit (Roche).
- **Purification d'ADN "Microcon"column:** (Millipore).
- **Réaction de ligation :** TA cloning Kits (Invitrogen).
- **Miniprep d'ADN plasmidique:** High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).
- **Maxiprep d'ADN plasmidique:** Plasmid Maxi KIT-tip-500 (QIAGEN).
- **Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose:** Nucleospin extract II (Macherey-Nagel).
- **MagneGST Pull-Down System** (Promega).
- **TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems** (Promega).
- **Flexi Vector system** (Promega).

## **IV. Transformations par choc thermique**

### **A. Transformation d'*E. coli* TOP10F'**

#### Préparation de bactéries (*E.coli* TOP10F') thermocompétentes :

- Inoculer 10 ml de milieu LB, contenant 5 µg de Tétracycline, avec *E. coli* (TOP10F') et Incuber la nuit à 37°C et à 130 g.
- Inoculer 400 ml de milieu LB, contenant 200 µg de Tétracycline, avec 10 ml de la préculture d'*E. coli* en transférant et incubé à 37°C-160 rpm jusqu'à ce que la DO<sub>590</sub> atteigne 0,2-0,3.
- Centrifuger les bactéries 10 minutes à 4°C-3500 g, éliminer le surnageant et ajouter 80 ml de tampon CCMB80 froid (4°C) stérile afin de laver les culots.
- Resuspendre délicatement le culot et aliquoter en 2x40 ml dans des tubes de 50 ml.
- Incuber 20 minutes sur glace, puis centrifuger 10 minutes à 4°C-3500 g.
- Éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 2 ml de tampon CCMB80 froid (4°C) stérile par tube.

- Pooler et tester la DO<sub>590</sub> des cellules. La DO<sub>590</sub> finale doit être comprise entre 1 et 1,5.
- Incuber 20 minutes sur glace, aliquoter par 50 µl et conserver à -80°C jusqu'à utilisation.
- Tampon CCMB80 :
  - 10 mM KOAc pH 7.0 (VWR),
  - 80 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (VWR),
  - 20 mM MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck),
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Merck),
  - 10 % (w/v) glycérol (Sigma),
  - Ajuster le pH à 6,4,
  - Stériliser par filtration sur stéricup 0,22 µm (Millipore) avant utilisation et stocker à 4°C.

Transformation par choc thermique des bactéries (*E.coli* TOP10F') thermocompétentes:

- Ajouter 30 ng de produit restriction-ligation à 50 µl de bactéries compétentes.
- Incuber 30 minutes sur glace puis 1 minute à 42° C dans un bain thermostatisé.
- Remplacer directement les cellules sur glace pendant 2 minutes.
- Ajouter 250 µl de SOC (2% Bactotryptone (Remel), 0,5% Extracted from yeast (Remel), 10 mM NaCl (VWR), 2,5 mM KCl (VWR), 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Pro analys, Merck), 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Vel)).
- Incuber une heure à 37° C dans un bain thermostatisé.
- Etaler 150 µl de bactéries transformées sur LB sélectif (antibiotique adéquat) (250 µg/ml d'ampicilline ou 200 µg/ml de kanamycine).
- Incuber une nuit à 37°C.

## B. Transformation de levure MaV103 (Méthode LiAc)

- Repiquer un clone de *Saccharomyces cerevisiae* MaV103.
- Inoculer 25 ml de milieu liquide sélectif adéquat avec MaV103 (2x 12,5 ml dans un flacon de 50 ml) et incuber à 30°C-160 rpm (C25KR Incubator Sheker) pendant une nuit.
- Resuspendre la culture de 12.5 ml dans 250 ml de milieu sélectif adéquat dans un erlen de 1 L stérile pour obtenir une DO<sub>600</sub> proche de 0,1.
- Incuber à 160 rpm à 30°C pendant 6 heures pour obtenir une DO<sub>600</sub> comprise entre 0,4 et 0,5. Si le milieu de croissance n'est pas un milieu sélectif mais un milieu riche (YEPD), une incubation de 3 à 4 heures est suffisante.
- Aliquoter les 250 ml dans 2 biberons stériles et centrifuger à 500 g-5 minutes (RT). Eliminer le surnageant et resuspendre délicatement le culot avec 25 ml d'eau stérile.
- Centrifuger à 500 g-5 minutes.
- Pendant la centrifugation, préparer du TE/LiAc : 1,1 ml de TE10x [400 mM Tris-acétate, 200 mM acétate de sodium, 10 mM EDTA, pH 8.0) (Biosciences Clontech); 1,1 ml de LiAc 1M (10x) (Biosciences Clontech); eau stérile pour 1 volume final de 10 ml]. Préparer du TAE/LiAc : [8 ml PEG 50% (Biosciences Clontech), 1 ml TE10x, 1 ml LiAc10x].
- Jeter le surnageant et resuspendre délicatement le culot dans 10 ml de TE/LiAc.
- Centrifuger 5 minutes-500 g et resuspendre le culot cellulaire dans du TE/LiAc (0,5 ml par 0,1 de DO<sub>600</sub>).
- Mélanger 100 ng de plasmide, 5 µl de DNAss (sperme de saumon SIGMA # D-9156 dénaturé pendant 10 minutes à 99° C puis immédiatement placé sur glace), 50 µl de cellules levuriennes, préparées ci-dessus et 300 µl de TE/LiAc/PEG ( 8 ml PEG 50%, 1 ml TE10x, 1 ml LiAc10x).

Noms	Séquences	Tm
WAK1 5'	5'-GTGAGTcccgggGAAGGGGCAACATCAACCTGG-3'	56
WAK1 3'	5'-GTGAGTctcgagGGGCAGCTCATAGTGGTGGTATCTAAGC-3'	56
WAK2 5'	5'-GTGAGTcccgggGAAGGGGCAACCTCGCAAGG-3'	58
WAK2 3'	5'-GTGAGTctcgagGGACAGCTATTAAGGGAATCTTTGCGG-3'	58
WAK3 5'	5'-GTGAGTcccgggGAAGGGGCAACATCAACCTCG-3'	56
WAK3 3'	5'-GTGAGTctcgagGGGCAGCTCATACTGGAGTTTAAGTCG-3'	56
WAK4 5'	5'-GTGAGTcccgggGAAGGGGCAAACCTTGCCTCG-3'	58
WAK4 3'	5'-GTGAGTctcgagGGGCAGGTATTAGTGGTGGTATTTAATTCG-3'	58
WAK5 5'	5'-GTGAGTcccgggGAAGGCGCAACCTCGCG-3'	57
WAK5 3'	5'-GTGAGTctcgagGGGGTTCTGATTTAAATACCACTACTATGAGCTGC-3'	57
PGBKT7/05/02	5'-CAAAGACAGTTGACTGTATCGCC-3'	56
PGBKT7 3'	5'-CGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTA-3'	52
5' pACT2	5'-CGATGATGAAGATACCCACCAAACC-3'	59
3' pACT2	5'-CGATGCACAGTTGAAGTGAACCTTGC-3'	59
WAK1 5' Sgfl	5'-TAAGGCGATCGCCATGAAGGGGCAACATCAACCTGG-3'	56
WAK1 3' Pmel	5'-TAAGGTTTAAACGCAGCTCATAGTGGTGGTATCTAAGC-3'	56
WAK2 5' Sgfl	5'-TAAGGCGATCGCCATGAAGGGGCAACCTCGCAAGG-3'	58
WAK2 3' Pmel	5'-TAAGGTTTAAACACAGCTATTAAGGGAATCTTTGCGG-3'	58

**Tableau 2. Amorces PCR utilisées.**



- Resuspendre délicatement puis incuber 30 minutes à 30° C, puis à 42°C pendant 15 minutes (bain thermostatisé). Centrifuger 5 secondes à 10000 g et enlever le surnageant à la pipette.
- Resuspendre le culot cellulaire dans 300 µl d'eau stérile et étaler 300 µl de levures sur milieu sélectif solide adéquat.

## V. Méthodes relatives aux acides nucléiques

### A. Extraction d'ARN des plantules d'*A. thaliana*

#### Eau DEPC :

Mettre sous hotte 0,1% de DEPC dans de l'eau désionisée. Incuber à 37°C pendant une nuit puis autoclaver.

Solution de NaOH/SDS (pour laver le matériel) : NaOH 1 N et SDS 0,1%. (Donc NaOH, sceau bleu, 80g/2L ; SDS, D14, 2g/2L).

- Broyer les plantules dans l'azote liquide sous hotte chimique.
- Ajouter 4,5 ml de Tripure (Roche) pour plus ou moins 450 mg de matériel broyé et homogénéiser.
- Après décongélation, transférer le liquide en eppendorfs (1,5 ml/tube).
- Agiter pendant 15 min sur roue, puis centrifuger à 9300 g-10 min à 4°C.
- Transférer le surnageant dans un autre tube et laisser reposer 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 225 µl de chloroforme/1,5 ml de Tripure puis secouer vigoureusement pendant 15 secondes et laisser reposer 3 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 9300 g-15 minutes à 4°C puis prélever la phase supérieure.
- Ajouter 563 µl d'isopropanol froid/1,5 ml de Tripure, mélanger vigoureusement pendant 15 secondes, laisser reposer 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 9300 g pendant 10 minutes-4°C puis éliminer le surnageant.
- Laver le culot avec 1 ml d'EtOH 75%/1,5 ml de Tripure.
- Bien mélanger, centrifuger à 600 g-5 minutes à 4°C, éliminer le surnageant et laisser sécher le culot. Resuspendre avec de l'eau DEPC (par 20 µl).
- Incuber les ARN pendant 10 minutes à 55-60°C, les placer sur glace puis pooler les surnageants. (Stockage à -80°C).
- Faire immédiatement une électrophorèse sur gel d'agarose 2%/EtBr (dépôt de 1 ou 2 µl).
- Mesurer immédiatement l'absorbance à 260 et 280 nm (1µl ARN/ml d'eau DEPC) puis calculer le rapport DO260/DO280 (rapport idéal >1,8).

#### Rem :

- Tous les ustensiles ont été autoclavés, lavés au NaOH/SDS, rincés à l'eau DEPC, puis passer au four pasteur pendant 16 heures.
- Un broyage plus long et un séchage de culot ne dépassant pas plus de 15 minutes améliorent la qualité des ARN extraits.

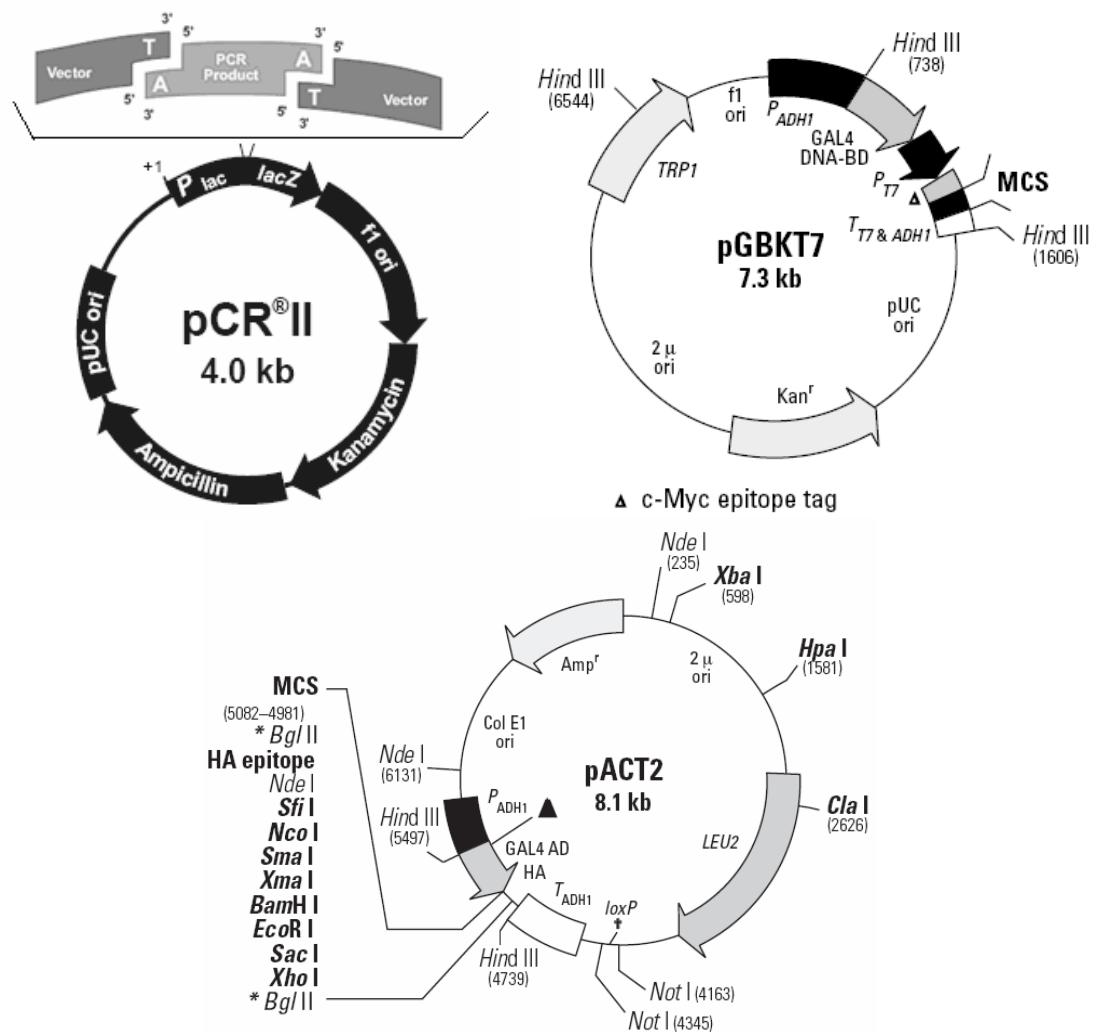


Figure 1. Cartes des plasmides utilisés.

## B. Rétro-transcription (“Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit”, Roche #04379012001)

- Toujours travailler sur glace.
- Par tube PCR :

Oligo(dt)	1 µl
RNA total	5 µg
Eau	8 µl
total	13 µl

- Incuber à 65° C-10 minutes pour dénaturer les structures secondaires des ARNs.
- Ajouter par tube :
  - 4 µl de Transcriptor RT Reaction buffer 5X,
  - 0,5 µl de Protector RNase inhibitor (40U/µl),
  - 2 µl de dNTP mix (10 mM chacun),
  - 0,5 µl de Transcriptor Reverse Transcriptase,
- Incuber 1 heure à 50°C.
- Inactiver la Réverse transcriptase par incubation à 85°C pendant 5 minutes puis mise sur glace du produit. Stockage possible à -20°C.

## C. Réaction PCR

- Les amorces utilisées sont listées dans le **Tableau 2**.
- Mastermix pour une réaction PCR:

	PCR classique	PCR sur colonies de levures	
Eau stérile			34,5 µl
Tampon (Promega)	5X	5X	10 µl
Mix de dNTP (Fermentas)	10 mM	10 mM	2 µl
Primers	10 pMol/µl	50 pMol/µl	1 µl
Echantillon	5 ng	5 ng	1 µl
Taq polymérase (Promega)	5 U/µl	5 U/µl	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub>		50 mM	0,4 µl

- Programme PCR:

	Température (°C)	Durée (classique)	Durée (PCR sur colonies)	Nbr de cycle
Dénaturation	95	5 min.	10 min.	1
Dénaturation	95	1 min; 35	1 min. 35	35-45
Hybridation	Tm-5	1 min.	1 min. 35	35-45
Elongation	75	2 min.	1 min. 30	35-45

## D. Electrophorèse sur gel d'agarose

- Préparer 50 ml d'agarose (Gibco BRL) 1 % dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate 4 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 et y ajouter 3 µl de Bromure d'éthidium (BET ; stock à 10 mg/ml; Sigma).
- Couler le gel dans un support adéquat et placer les peignes.
- Ajouter 1 volume de solution de chargement 6X (bleu de bromophénol 0,025 %, glucose 40 %) à 5 volumes d'échantillon.
- Placer dans la cuve d'électrophorèse (Pharmacia biotech GNA 100) contenant du tampon TAE 1X.
- Déposer dans les puits un volume adéquat d'échantillon (ainsi que 5 µl standard de taille Smart Ladder (Eurogentec)).
- Faire migrer l'échantillon pendant environ 1 h, sous 80-90 mA 150 V.
- Visualiser les acides nucléiques sur transilluminateur (302 nm-UV).

## E. Restrictions enzymatiques

Restriction des plasmides PGBKT7 et pACT2 (carte des plasmides, Fig. 1) :

- 1 µl tampon 4 (10X).
  - 15 µl d'eau MilliQ.
  - 200 ng de plasmide.
  - 1 µl XmaI (10.000 U/ml; NEB).
  - 1 µl SalIHF (20.000 U/ml; NEB).
  - 0.3 µl BSA (NEB).
- Incubation de 4h à 37°C

Restriction des EC-WAKs :

- 1 µl tampon 4 (10X).
  - 7 µl d'eau MilliQ.
  - 100 ng de EC WAK-PCRII.
  - 1 µl XmaI (10.000 U/ml; BioLabs).
  - 1 µl XhoI (20.000 U/ml ; BioLabs).
  - 0.3 µl BSA (NEB).
- Incubation de 4h à 37°C

## F. Ligation des EC WAKs dans PGBKT7 et pACT2

- 2 µl T4 DNA ligase (3U/µl ; Promega).
- 2 µl tampon de la T4 DNA ligase (10X).
- X µl d'insert.
- Y µl de plasmide.
- Z µl d'eau de lyse.

Cette formule permet de connaître les quantités d'insert et de plasmide optimales pour l'étape de ligation.

$$X \text{ ng insert} = (Y \text{ bp insert}) * (Z \text{ ng plasmide}) / (\text{taille en bp plasmide})$$

Int WAK1 5'	5'-AGGCTGATGGAGAATGTAATGG-3'
Int WAK1 3'	5'-CTTATCATCTTCAACGAGAAAAGC-3'
Int WAK2 5'	5'-CAAGGAAAACAGACTGACTACATTGC-3'
Int WAK2 3'	5'-CCATCTTCAACGAGAAAGGCGTA-3'
PGBKT7/05/02	5'-CAAAGACAGTTGACTGTATCGCC-3'
PGBKT7 3'	5'-CGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTA-3'

**Tableau 3. Amorces utilisées pour les séquençages.**

Solution stop	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
glycogène	9	18	27	36	45	54	59,5	68	76,5	85	93,5	102
acétate	18	36	54	72	90	108	119	136	153	170	187	204
H2O	14,4	28,8	43,2	57,6	72	86,4	95,2	109	122,4	136	149,6	163,2
EDTA	3,6	7,2	10,8	14,4	18	21,6	23,8	27,2	30,6	34	37,4	40,8

**Tableau 4. La numérotation en orange correspond à 1 run (= 8 puits) pour pouvoir préparer la solution stop en une fois.**

## F. Réaction de séquençage

Les amorces utilisées pour le séquençage sont répertoriées dans le **Tableau 3**.

### Matériels :

- CEQ DTCS quick start kit.
- CEQ sequencing reaction buffer kit.
- Stop solution (**tableau 4**).
- CEQ sample loading solution (SLS).
- SEQ sequencing separation buffer.
- Séquenceur capillaire Beckman CEQ 8000.

### Protocole :

- Sur une plaque multipuits, mettre dans chaque puit :
  - • 8 µl d'eau stérile,
  - • 1 µl de produit à séquencer,
  - • 1 µl d'amorce 10 pmol/µl,
- Dénaturer le mélange à 94°C pendant 15 minutes puis mettre immédiatement sur glace.
- Utiliser un mix de séquençage (dATP, dCTP, dTTP, dITP, ddUTP, ddGTP, ddCTP, ddATP (WellRED label), Tris –HCL, MgCl<sub>2</sub>, reaction buffer, pH 8.9, Thermo Sequenase DNA Polymerase Pyrophosphatase) qui contient 32 µl, prévu pour 8 puits. Il faut lui ajouter 50 µl d'eau stérile.
- Ajouter 9,5 µl de ce mix dans chaque tube.
- Lancer une réaction de séquençage avec le programme suivant :

Nombre de cycles	Température	Durée
1X	92°C	1 min. 30
40X	96°C	20 sec.
	50°C	20 sec.
	60°C	4 min.

- Après la réaction de séquençage, ajouter 5 µl de « stop solution » et ajouter 60 µl d'éthanol 95 % froid.
- Centrifuger 60 min-2700 g à 4° C.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 200 µl d'éthanol 70 % froid.
- Centrifuger 15 min-2700 g et éliminer le surnageant.
- Répéter une seconde fois cette étape de lavage à l'éthanol 70 %.
- Placer les échantillons 30 minutes au speedvac.
- Resuspendre dans 40 µl de Sample Loading Solution (Beckman).
- Pipeter pour resuspendre le culot et transférer le contenu de la plaque « PCR thin wall » dans une plaque de séquençage Beckman.
- Ajouter dans chaque puits une goutte d'huile minérale.
- Ajouter jusqu'à trois quarts des puits du tampon de séparation (Genome Lab Beckman coulter) dans une deuxième plaque multi-puits.

## **VI. Méthodes relatives aux protéines**

### **A. Extraction de protéines à partir de levures MaV103**

#### Préparation des cultures :

- Préparer une culture liquide de MaV103 (clone d'intérêt) dans 5 ml d'un milieu sélectif approprié et incubé pendant la nuit à 30°C à 180 rpm. Egalement préparer une culture de 10 ml de levures non transformées dans un milieu non sélectif comme contrôle négatif.
- Ajouter 50 ml de milieu sélectif adéquat à l'entièreté de la préculture.
- Incuber à 30°C sous agitation de 220-250 rpm sur agitateur orbital jusqu'à quand la DO<sub>600</sub> atteigne 0,4-0,6.
- Multiplier la DO<sub>600</sub> d'1 ml d'échantillon par le volume de la culture pour obtenir le nombre total d'unités cellulaires DO<sub>600</sub>. Ce nombre servira lors de la préparation de l'extrait protéique.
- Refroidir rapidement la culture en la transférant dans 2 tubes de 50 ml froid entourés de glace jusqu'à mi-hauteur.
- Immédiatement placer le tube dans un rotor pré-refroidi (4°C) et centrifuger à 10000 g pendant 5 minutes à 4°C.
- Immédiatement geler le culot cellulaire dans de l'azote liquide.
- Stocker les cellules à -70°C jusqu'à utilisation.

#### Préparation des extraits protéiques :

- Préparer le cracking buffer complet et le préchauffer à 60°C. 100 µl de cracking buffer sont nécessaire par 7,5 unités cellulaires.
- Rapidement mettre sur glace après avoir bien resuspendu les cellules
- Comme l'excès initial de PMSF, dans le cracking buffer, se dégrade rapidement, ajouter 1 mM de PMSF 100X aux échantillons après 15 minutes et approximativement toutes les 7 minutes jusqu'à la fin de l'expérience.
- Transférer chaque suspension cellulaire dans un eppendorf de 1,5 ml contenant 80 µl de billes de verre par 7,5 unités cellulaires.
- Chauffer les échantillons à 70°C pendant 10 minutes.
- Vortexer pendant 1 minute.
- Culoter les débris et cellules non-cassées en centrifugeant à 10 000 g pendant 5 minutes à 4°C.
- Transférer les premiers surnageants dans des nouveaux eppendorfs de 1,5ml et incubé 3-5 min à 100°C (bain thermostatisé).
- Répéter les 3 étapes précédentes et combiner les deuxième surnageants avec les premiers surnageants correspondant.

#### Préparation des solutions :

- Solution stock de cracking buffer (100 ml) :
  - 48 g Urée 8M (Sigma),
  - 5 g SDS 5 % (Sigma),
  - 0,481 g Tris-HCl pH 6,8 40 mM (Sigma),
  - 0,00378 g EDTA 0,1 mM (Sigma),
  - 0,04 g Bleu de bromophénol 0,4 mg/ml (Sigma),
  - Eau désionisée jusqu'à un volume de 100 ml,
  - Ajuster à pH 6,8.
- Cracking buffer complet (préparation d'1,13 ml, suffisant pour 1 extraction) :
  - 1 ml de solution stock de cracking buffer,
  - 10 µl de β-mercaptoéthanol (Sigma),
  - pastille de protease inhibitor cocktail (Roche),
  - 50 µl de solution stock 100X de PMSF (Fluka).

## B. Western Blot

### 1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Gels :

	Running gel 15%	Stacking gel 5%
Acrylamide mix 30% (Rio-Rad)	2,5 ml	330 µl
Eau	1,1 ml	1,4 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	1,3 ml	
Tris 1,5 M pH 6,8		250 µl
SDS (Sigma)	50 µl	20 µl
APS 10%	50 µl	20 µl
TEMED (Sigma)	2 µl	2 µl

Méthode :

- Monter les plaques d'électrophorèse selon les indications du fabricant Bio-Rad (spacers de 0,75 mm d'épaisseur).
- Couler le running gel et couvrir d'éthanol 100 %. Laisser polymériser 30 minutes.
- Couler le stacking gel et monter le peigne adéquat.
- Monter les plaques sur le support d'électrophorèse et déposer celui-ci dans la cuve (Cuve Biorad miniprotean II) en suivant les indications du fournisseur.
- Remplir les compartiments de tampon d'électrophorèse Loading Buffer (Tris 25 mM; Glycine 250 mM; pH 8,3; SDS 0,1 %).
- Charger le gel avec l'échantillon (en présence de 1X SDS gel Loading Buffer : Tris-HCl 50 mM; pH 6,8; DTT 100 mM; SDS 2 %; Bleu de bromophénol 0,1 %; Glycérol 10 %) et 5 µl d'étalon de poids moléculaire (Precision Plus Standards, Bio-Rad).
- Régler l'appareil sur 150 V et attendre que le front de migration soit arrivé au bas du gel.
- Le gel peut ensuite être coloré au bleu de Coomassie ou utilisé pour un Western blot.

### 2. Coloration des protéines au bleu de Coomassie

- Plonger le gel dans la solution de coloration (bleu de Coomassie (Brillant blue R250) 0,1 %; méthanol 40 %; acide acétique 10 % et eau 50 %) pendant 30 minutes.
- Retirer le gel de la solution de coloration et le plonger dans la solution de décoloration (Méthanol 40 %; Acide acétique 10 % et eau 50 %) pendant 30 minutes en renouvelant plusieurs fois la solution jusqu'à décoloration adéquate.

### 3. Western blot-semi-dry

Protocole de transfert :

- Séparer le gel d'empilement du gel de migration.
- Equilibrer le gel de migration dans le tampon de transfert (Tris 48 mM pH 9,2; Glycine 39 mM; 0,0375 % SDS; 20 % Méthanol) pendant 5 minutes.
- Couper du papier buvard et la membrane PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences) à la dimension du gel de migration.
- Tremper la membrane dans du méthanol pendant 5 sec.
- Transférer sur la membrane PVDF dans l'eau distillée pendant 5 min. puis l'incuber dans le tampon de transfert pendant 5 min.
- Imbibber les papiers buvard dans le tampon de transfert (Bio-Rad Trans-Blot SD) en évitant les bulles d'air.
- Transférer les protéines pendant 20 min. à 15 V.



- Vérifier l'efficacité du transfert en colorant le gel au Bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie (Brillant blue R250) 0,1 %; Méthanol 40 %; Acide acétique 10 % et eau 50 %).

#### Protocole de révélation de la membrane :

- Saturer la membrane pendant une heure avec la solution de saturation (Tween-20 0,1 % en TBS + 3 % de poudre de lait.
- Rincer la membrane dans du TBS (Tris-buffered saline : 0,14 M NaCl; 27 mM KCl; 25 mM Tris pH 7,4 + 0,1 % Tween-20) pendant 5 minutes sous agitation.
- Incuber la membrane à température ambiante pendant 1 h avec l'anticorps anti-c-myc (Invitrogen) dilué 5000X dans du tampon TBS + 1 % BSA (Sigma) + 0,1 % Tween-20.
- Laver la membrane pendant 3 fois à température ambiante avec le TBS + 0,1 % Tween-20 pendant 5 minutes.
- Incuber la membrane pendant 1 h avec l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (anti-souris) (Sigma) dilué 15000X dans du tampon TBS + 1 % BSA (Sigma) + 0,1 % Tween-20.
- Laver la membrane 3 fois avec du tampon TBS + Tween-20 0,1 % pendant 5 minutes.
- Révéler la membrane avec 10 ml de solution de révélation BM Purple(Roche).

#### Solutions :

- Tampon d'électrophorèse Loading Buffer (pH 8,3) :
  - Tris 25 mM,
  - Glycine 250 mM,
  - SDS 0,1 %.
- 1X SDS gel Loading Buffer (pH 6,8):
  - Tris-Hcl 50 mM,
  - DTT 100 mM,
  - SDS 2 %,
  - Bleu de bromophénol 0,1 %,
  - Glycérol 10 %.
- Solution de coloration :
  - Bleu de Coomassie (Brillant blue R250) 0,1 %,
  - Méthanol 40 %,
  - Acide acétique 10 %,
  - Eau 50 %.
- Solution de décoloration :
  - Méthanol 40 %,
  - Acide acétique 10 %,
  - Eau 50 %.
- Tampon de transfert (pH 9,2):
  - Tris 48 mM,
  - Glycine 39 mM,
  - 0,0375 % SDS,
  - Méthanol 20 %.
- Solution Tris-Buffered Saline (TBS) (pH 7,4):
  - NaCl 0,14 M,
  - KCl 27 mM,
  - Tris 25 mM,
  - Tween-20 0,1 %.
- Solution de saturation
  - Tween-20 0,1 %,
  - TBS,
  - 3 % de poudre de lait.

# **Résultats et Discussion**

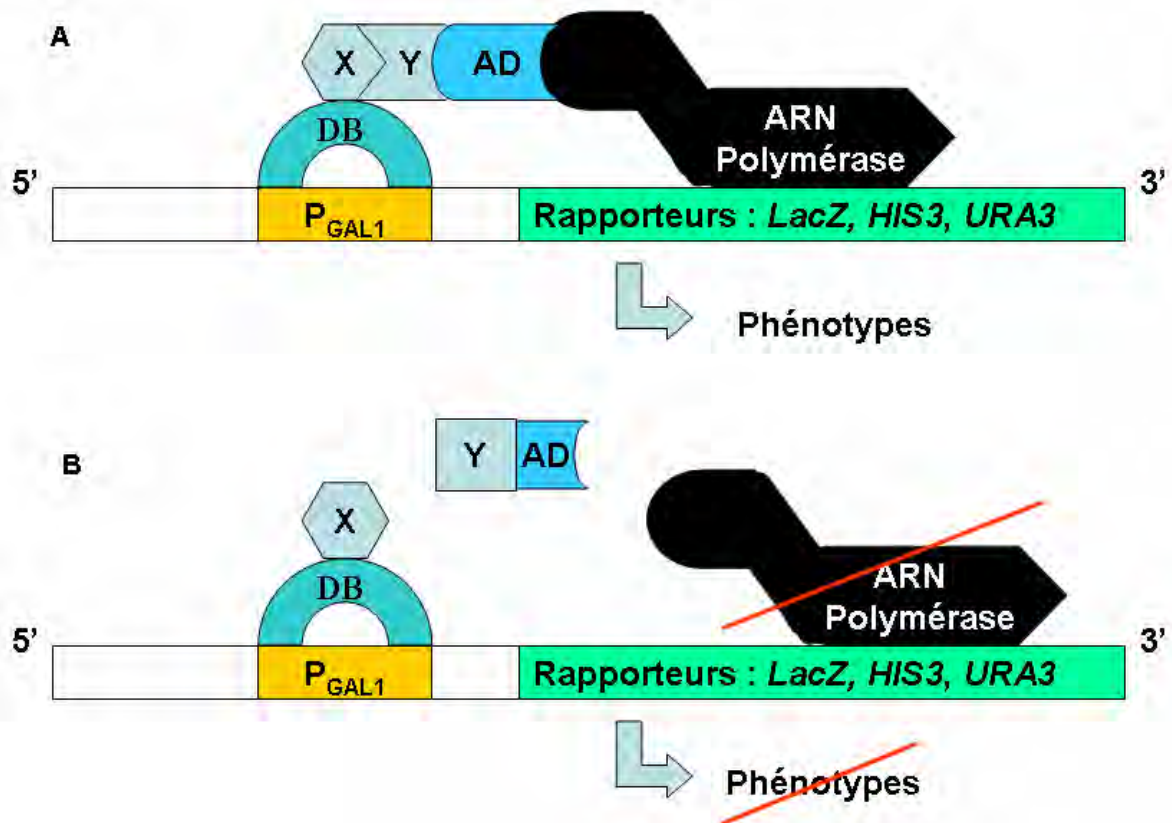


Figure 1. Principe du double hybride. *A* : la protéine appât (X) et la protéine proie (Y) interagissent et reforment un facteur de transcription Gal4p fonctionnel. L'ARN polymérase est par conséquent activée et les gènes rapporteurs sont transcrits. *B* : les protéines X et Y n'interagissent pas. Il n'y a donc pas de transcription des gènes rapporteurs.

# Préambule

Les récepteurs WAKs jouent un rôle important dans la défense contre les pathogènes, ainsi que dans la croissance et le développement d'*Arabidopsis thaliana*. Même si très peu de choses sont connues sur leur mode de fonctionnement, il semblerait que leur présence soit nécessaire à la survie de la plante. Notre laboratoire s'intéresse depuis quelques années à l'interaction entre WAK1 et la pectine dans le cadre de la transduction du signal relative à une elicitation par des fragments pectiques. La majorité des RLKs connus semblant homo- ou hétérodimériser pour pouvoir initier une voie de transduction du signal, nous avons voulu déterminer si les isoformes WAKs étaient capables d'interagir entre eux. Pour ce faire, la technique du double hybride en levure avec appât et proie connus a été utilisée.

Le système double hybride a été décrit en 1989 par S. Fields et O-K. Song (Fields and Song, 1989). Le concept de base a émergé d'expériences sur les facteurs de transcription tel que Gal4p (Walhout *et al.*, 1999). Ces facteurs de transcription augmentent le taux de transcription de leurs gènes cibles en se liant à des séquences d'ADN spécifiques situées en amont. Ils activent ainsi l'ARN polymérase au niveau des promoteurs correspondant. Il a été démontré que le domaine de liaison à l'ADN (DB) et le domaine d'activation (AD) du facteur de transcription sont localisés dans des domaines physiquement séparables de Gal4p. De plus, il a été mis en évidence que les fusions DB-AD ne nécessitaient pas de liaison covalente pour déclencher la transcription de leurs gènes cibles (Walhout *et al.*, 1999). Ces caractéristiques ont été mises à profit pour développer le système double hybride.

Ce système est basé sur la reconstitution fonctionnelle d'un facteur de transcription qui active l'expression de gènes rapporteurs. Dans notre expérience, le facteur de transcription de levure Gal4p a été utilisé. Lors d'un criblage double hybride, une protéine appât (X) est fusionnée au domaine de liaison à l'ADN (DB) d'un facteur de transcription et une (des) protéine(s) proie(s) (Y) au domaine d'activation de la transcription (AD) du même facteur de transcription. Quand les protéines hybrides sont co-exprimées dans la levure et quand X et Y peuvent interagir l'un avec l'autre, un facteur de transcription fonctionnel est reconstitué puisque DB et AD sont physiquement proches. Le facteur de transcription ainsi reconstitué active l'expression de gènes rapporteurs (Fig. 1). Lorsque cette technique fut développée, un seul gène rapporteur était utilisé et le nombre de faux positifs était très élevé. Actuellement, dans l'optique d'une minimisation du nombre de faux positifs identifiés, trois gènes rapporteurs sont utilisés: *HIS3*, *URA3* et *lacZ*. L'expression de ces gènes est estimée par la croissance sur un milieu minimal manquant d'histidine (pour *HIS3*), ou d'uracile (pour *URA3*), ou par un essai colorimétrique (bleu-blanc) (Boulton, 2006).

Afin de mettre en évidence une éventuelle interaction inter et intra WAKs, un criblage double hybride avec appât et proie connus a été réalisé suivant le **schéma expérimental** présenté ci-dessous.

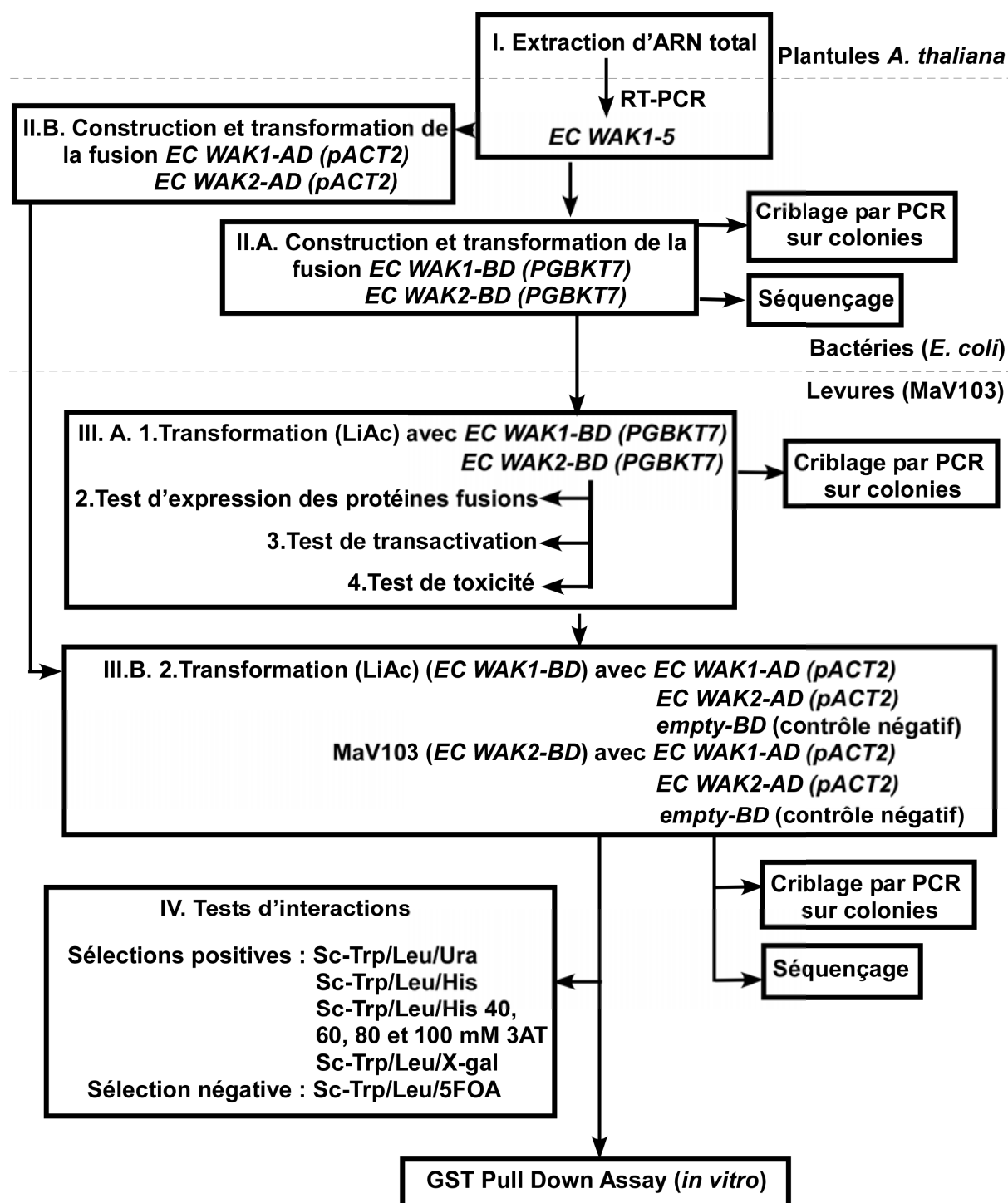
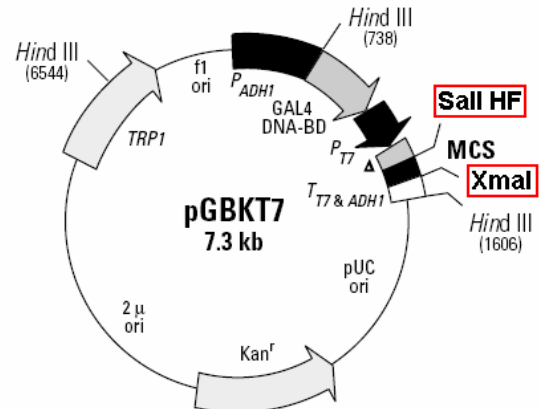


Figure 2. Schéma expérimental suivi pour réaliser les tests d'interaction des WAKs en levures.

Les plasmides PGBKT7 et pACT2 ont été utilisés pour fusionner les protéines EC WAKs avec le domaine de liaison à l'ADN et/ou le domaine activateur de la transcription du facteur de transcription Gal4p.

**PGBKT7** est un plasmide de 7,3 kb permettant la fusion des EC WAKs, appât, avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p. Il contient une origine de réplication de levure (2 $\mu$ ) et une origine de réplication de bactérie (pUC). En levure, les protéines de fusion sont surexprimées sous le contrôle des promoteur et terminateur ADH1. Le plasmide PGBKT7 contient le gène *TRP1* qui permet la survie des levures contenant ce plasmide sur un milieu ne contenant pas de tryptophane. De même, le gène *Kan<sup>r</sup>* permettra la survie d'hôtes bactériens sur un milieu contenant de la kanamycine. Le site multiple de clonage contient des sites de restriction uniques dont *Sall* HF et *XmaI* utilisés pour permettre la fusion de l'insert avec le domaine de liaison à l'ADN. L'épitope c-myc, en fusion avec l'insert, peut être reconnu par un anticorps spécifique pour mettre en évidence l'expression de la protéine de fusion par western blot. Ce plasmide contient aussi le promoteur et le terminateur T7 utilisé pour la transcription et la traduction *in vitro* (Fig. 3).



▲ c-Myc epitope tag

Figure 3. Carte du plasmide PGBKT7.

**pACT2**, un plasmide de 8,1 kb permet la fusion des EC WAKs avec le domaine activateur (AD) du facteur de transcription Gal4p. Il contient une origine de réplication de levure (2 $\mu$ ) et une origine de réplication de bactérie (pBR322). En levure, les protéines de fusion sont surexprimées sous le contrôle du promoteur et du terminateur ADH1. pACT2 contient le gène *LEU2* qui permet la survie des levures contenant ce plasmide sur un milieu ne contenant pas de leucine. De même, le gène *Amp<sup>r</sup>* permettra la survie d'hôtes bactériens sur un milieu contenant de l'ampicilline. Le site multiple de clonage contient des sites de restriction uniques dont *XmaI* et *XhoI* utilisés dans notre expérience pour permettre la fusion de l'insert avec le domaine de liaison à l'ADN. L'épitope de l'hémagglutinine (HA), aussi fusionné à l'insert, peut être reconnu par un anticorps spécifique pour mettre en évidence la protéine fusion par western blot (Fig. 4).

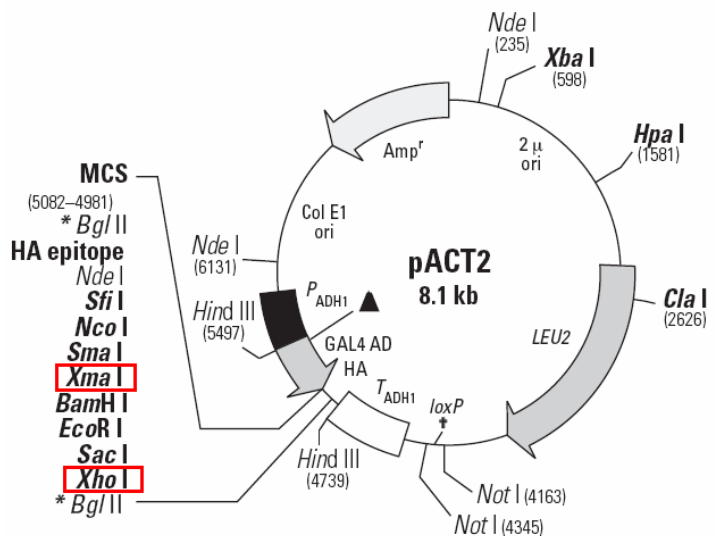
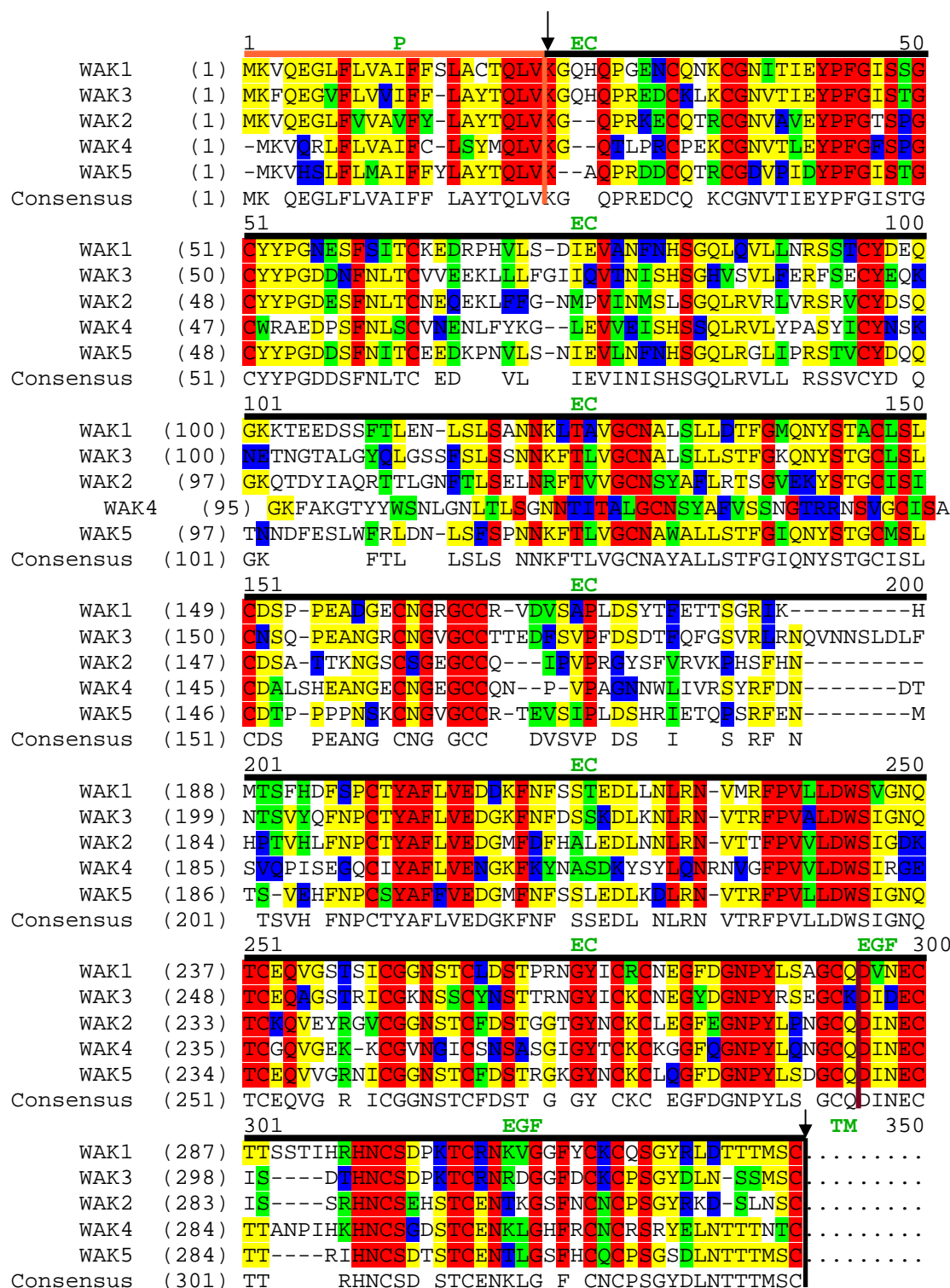


Figure 4. Carte du plasmide pACT2



**Figure 5.** Alignement des séquences protéiques des domaines extracellulaires des 5 WAKs. Les acides aminés identiques sont indiqués en rouge, les blocs d'identité en jaune et les acides aminés similaires en vert. Le cadre rose désigne le peptide signal (P). Le cadre noir correspond au domaine extracellulaire (EC). Les flèches délimitent les domaines extracellulaires des WAKs complets, excepté le peptide signal (WAK1<sub>23-341</sub>, WAK2<sub>23-341</sub>, WAK3<sub>23-333</sub>, WAK4<sub>23-340</sub>, WAK5<sub>23-339</sub>).

# I. Amplification des *EC WAKs* d'*A. thaliana*

## A. Conception des amorces pour l'amplification des *EC WAKs*

Dans une optique d'identification des interactions potentielles entre les WAKs, seule le domaine extracellulaire des WAKs, excepté le peptide signal puisque les tests d'interaction ont lieu dans le noyau, est utilisé pour nos expériences. Cette portion des protéines WAKs sera dénommée "EC WAK" tout au long de ce manuscrit. Ce domaine contient entre autres les sous-domaines EGF connus pour être impliqués dans les interactions protéine-protéine. Dans un premier temps, la séquence la plus étendue possible codant pour le domaine extracellulaire des WAKs, a été amplifiée pour les premiers tests d'interaction. Par la suite, si les EC WAKs interagissent, la taille de ces séquences sera réduite progressivement afin de déterminer quelle portion est spécifiquement responsable de cette interaction.

Les amorces permettant l'amplification des séquences codant pour les domaines extracellulaires des WAKs ont été définies suite à des alignements de séquences protéiques issues de la banque de données « Tair Arabidopsis » (<http://www.arabidopsis.org/>). Ces alignements ont permis de délimiter le peptide signal à exclure et la région à amplifier (Fig. 5). Cette dernière comprend les acides aminés 23 à 341, 23 à 339, 23 à 333, 23 à 340 et 23 à 339 du domaine extracellulaire des WAK1 à 5, respectivement. Chaque amorce a été conçue avec un site de restriction (XhoI ou XmaI) absents dans les séquences à amplifier et permettant une insertion dirigée des *EC WAK* dans plasmides PGBKT7 et pACT2 (Fig. 6). Le plasmide PGBKT7 a permis la fusion du domaine extracellulaire des WAKs avec le domaine de liaison à l'ADN (BD) du facteur de transcription Gal4p. pACT2 a permis, quant à lui, de fusionner le domaine extracellulaire des WAKs avec le domaine activateur de la transcription (AD) du même facteur de transcription. Le site de restriction XhoI absent du plasmide PGBKT7 est par contre compatible avec le site de restriction SalI HF présent dans le plasmide PGBKT7, autorisant ainsi le clonage. Un nucléotide à l'extrémité 3' du site XmaI a été ajouté pour ne pas décaler la phase de lecture. Les six nucléotides insérés à l'extrémité 5' de ce même site ayant pour rôle l'optimisation de l'efficacité de la restriction enzymatique lors des clonages ultérieurs.

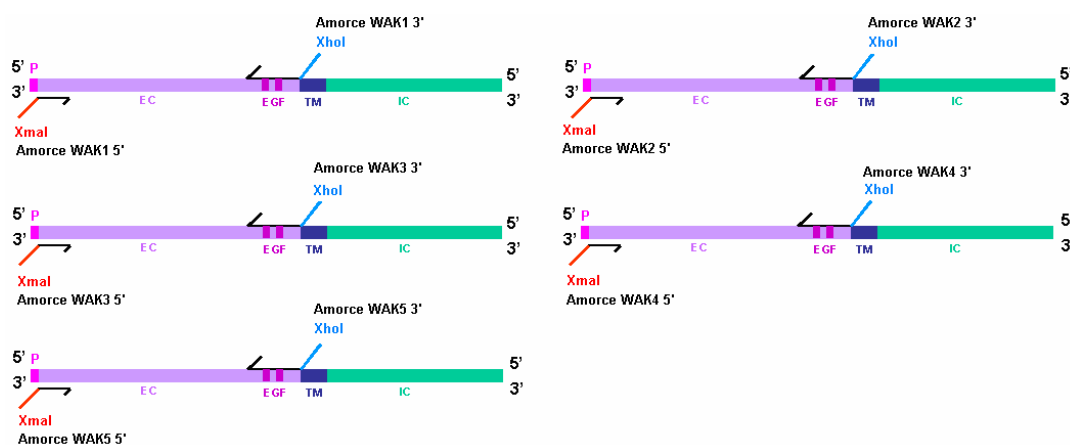


Figure 6. Schématisation de la séquence codant pour la protéine WAK. La séquence codant pour le domaine extracellulaire des WAKs a été amplifiée avec des amorces contenant les sites de restriction XmaI et XhoI.



## B. Extraction d'ARN totaux et RT-PCR

Afin d'exclure l'intron présent au sein de la séquence codant pour les domaines extracellulaires des WAKs, une extraction, au Tripure, d'ARN totaux de 4 plantules d'*Arabidopsis thaliana* ecotype columbia-O a d'abord été effectuée (Fig. 7). Une concentration en ARN de 1,48 µg/µl avec une pureté de 1,81 (DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub>) a été obtenue.

Une étape de rétro-transcription a été réalisée sur 5 µg d'ARN totaux afin d'obtenir des ADN complémentaires simple brin en utilisant des oligo(dT). Les oligo(dT), s'hybridant sur la queue poly A des ARNm, permettent l'amplification de l'ARNm. Il est peu probable que des oligo aléatoires, s'hybridant à n'importe quel endroit sur les ARNm, permettent l'amplification des séquences entières codant pour le domaine extracellulaire des WAKs. Par la suite, une PCR permettant d'amplifier spécifiquement chaque *EC WAK* a été réalisée (Fig. 8).

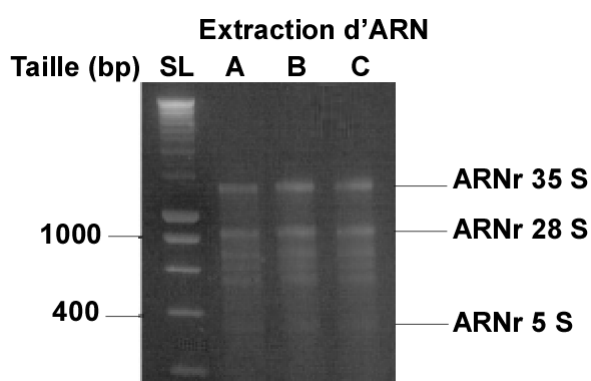


Figure 7. Migration sur gel d'agarose 1%-BET de 7 µg d'ARN totaux extraits de plantules d'*Arabidopsis thaliana* issus de trois extractions différentes (SL : Smart Ladder, Eurogentec).

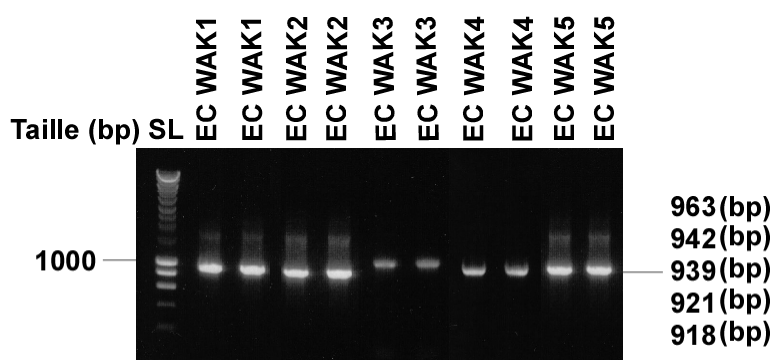


Figure 8. Migration sur gel d'agarose 1%-BET du produit d'amplification des séquences codant pour les domaines extracellulaires des 5 WAKs. Deux PCR ont été réalisées pour chaque *EC WAK*. Les *EC WAKs* 1-5 ont respectivement une taille de 942, 918, 963, 939 et 921 paires de bases (SL: Smart Ladder, Eurogentec).

## II. Fusion des EC WAKs avec BD ou AD

### A. Clonage des *EC WAKs* dans PCRII

Les séquences codant pour les domaines extracellulaires des WAKs (*EC WAKs*) ont été clonées dans un plasmide, PCRII, à haut nombre de copies. Les gènes *Kan<sup>r</sup>* et *Amp<sup>r</sup>* permettent aux bactéries possédant ce plasmide de se développer sur un milieu sélectif contenant respectivement de la kanamycine et/ou de l'ampicilline. Le clonage TA (Fig. 9) a été effectué après une étape de purification (Microcon) des produits PCR. Les bactéries (*E. coli* Top10F'), transformées par choc thermique avec *EC WAKs*-PCRII et se multipliant sur milieu sélectif à l'ampicilline, ont été criblées par PCR avec des amorces spécifiques de chaque WAK (Fig. 10).

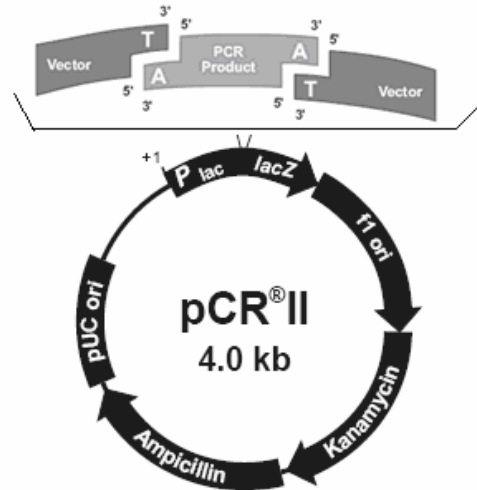


Figure 9. Carte du plasmide PCRII et principe du clonage TA.

A ce stade, les *EC WAKs* sont disponibles en bactéries dans le plasmide PCRII pour construire les protéines de fusion *EC WAK*-BD et *EC WAK*-AD. Une miniprep a été réalisée pour un clone contenant la séquence codant pour le domaine extracellulaire de chaque WAK dans le plasmide PCRII afin de récupérer cette construction pour la restriction des *EC WAKs*.

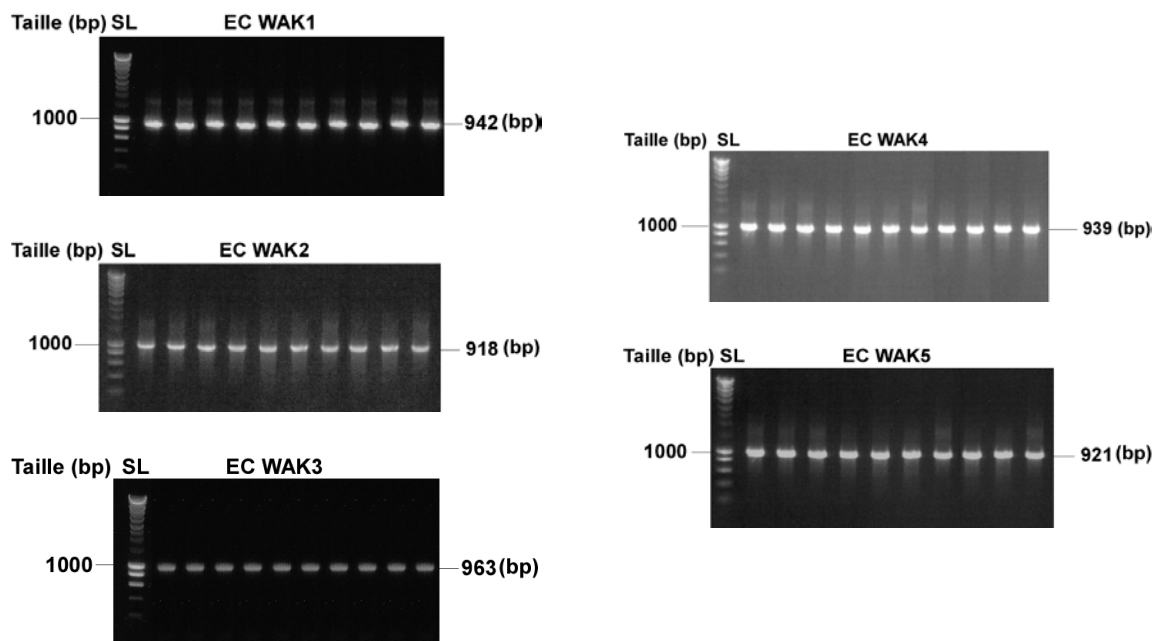


Figure 10. Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits de criblages PCR sur colonies bactériennes des *EC WAKs*. Un criblage sur 10 colonies a été réalisé pour chaque *EC WAK*. Les *EC WAKs* 1-5 ont respectivement une taille de 942, 918, 963, 939 et 921 paires de bases (SL: Smart Ladder, Eurogentec).

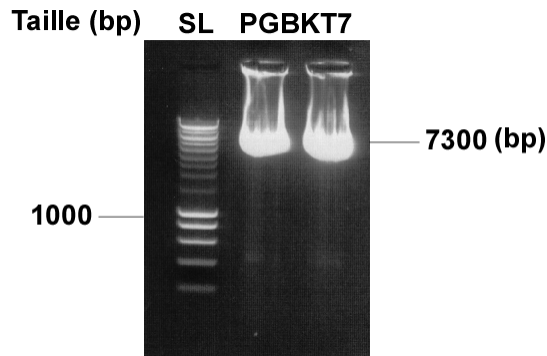


Figure 11. Migration sur gel d'agarose 1%-BET de 300 ng de la maxiprep du plasmide PGBKT7 possédant une taille de 7,3 Kb (SL : Smart Ladder, Eurogentec).

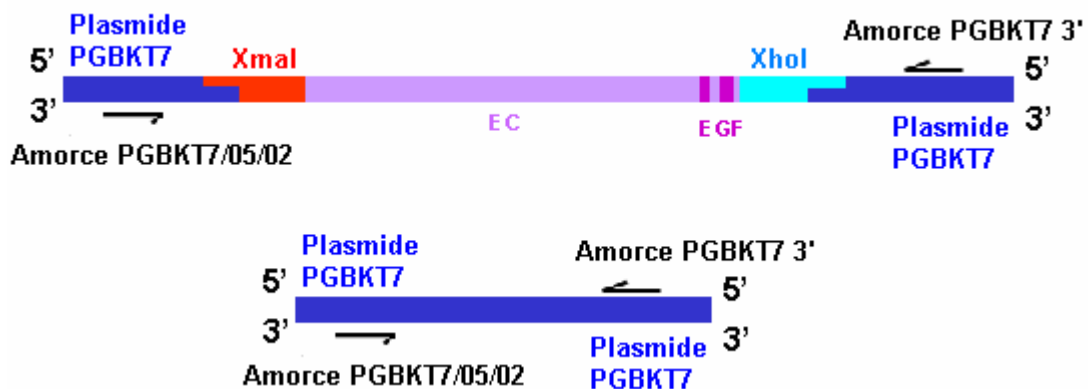


Figure 12. Schématisation de la construction *EC WAKs*-PGBKT7 avec la position des amorces PGBKT7/05/02 et PGBKT7 3' hybridées sur le plasmide PGBKT7.

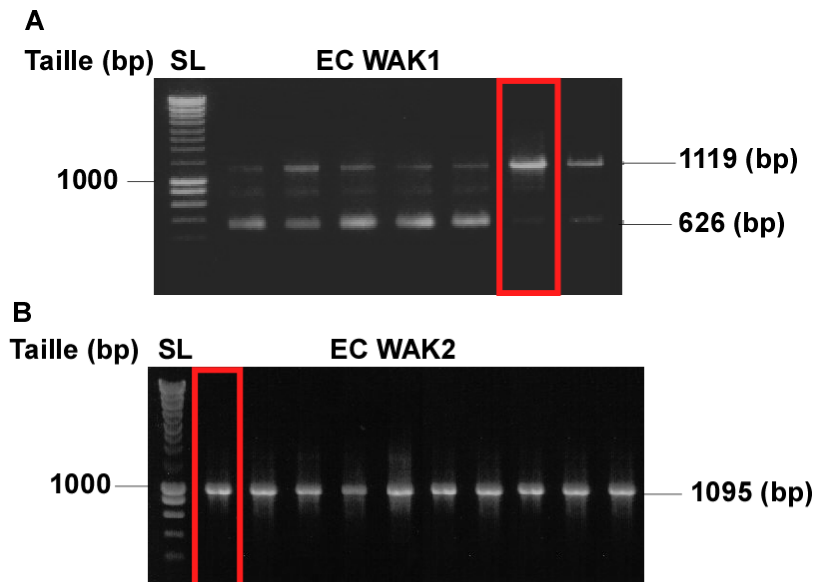


Figure 13. A. Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits du criblage par PCR sur colonies de bactéries (*E. coli* TOP10 F'). Chaque piste correspond à un clone testé. 1119 bp : *EC WAK1*; 626 bp : fragment de PGBKT7 obtenu en absence d'insert (SL : Smart Ladder, Eurogentec). B. Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits du criblage par PCR sur colonies de bactéries (*E. coli* TOP10 F'). Chaque piste correspond à un clone testé. 1095 bp : *EC WAK2* obtenu en absence d'insert (SL : Smart Ladder, Eurogentec).

## B. Clonage des *EC WAKs* dans le plasmide PGBKT7

Les expériences ont été poursuivies uniquement avec *EC WAK1* et *EC WAK2*.

Des bactéries (*E. coli* Top10F') contenant le plasmide PGBKT7 ont été mises en culture afin de réaliser une maxiprep pour isoler le plasmide en grande quantité (Fig. 11). Le plasmide PGBKT7 a été restreint avec les enzymes de restriction XmaI et SalI HF et les plasmides PCRII contenant *EC WAK1* et *EC WAK2* ont été restreints avec les enzymes de restriction XmaI et XhoI. La restriction du plasmide PGBKT7 permet d'obtenir un fragment de 7294 bp correspondant au plasmide PGBKT7 et un fragment de 6 bp. Tandis que les produits de la restriction des *EC WAKs*-PCRII contiennent un fragment de 933 bp correspondant à *EC WAK1* ou un fragment de 909 bp correspondant à *EC WAK2* et un fragment de 4 kb correspondant au plasmide PCRII. La restriction par XhoI produit un bout protrudent compatible avec celui produit par SalI HF, du plasmide PGBKT7. Ainsi, comme SalI HF est présent dans la séquence nucléotidique des *EC WAKs*, le site de restriction XhoI a été utilisé pour restreindre les *EC WAKs*. Les produits de restriction ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les ADN contenu dans les bandes de 933 bp (*EC WAK1*) ou 909 bp (*EC WAK2*) et 7294 bp (PGBKT7 linéarisé) ont été extraits du gel et purifiés par nucléospin.

Après un contrôle à buts quantitatif et qualitatif sur gel, *EC WAK1* ou *EC WAK2* et PGBKT7 restreints ont été ensuite ligués par une T4 DNA ligase afin d'obtenir les constructions *EC WAK1*-PGBKT7 et *EC WAK2*-PGBKT7, qui ont été transformées par choc thermique en *E. coli* (Top10 F'). Un criblage PCR des colonies se développant sur milieu sélectif (kanamycine) a été réalisé avec les amorces s'hybridant sur le plasmide PGBKT7 pour discriminer les bactéries contenant les *EC WAKs* dans le plasmide par rapport à celles qui contiennent le plasmide vide (Fig. 12). Le clone 6 de la construction *EC WAK1* et le clone 1 de la construction *EC WAK2* ont été utilisés pour la suite de nos expériences (Fig. 13A et B) puisque les autres clones de la construction *EC WAK1* contenaient aussi le plasmide vide.

Un séquençage des constructions *EC WAK1*-PGBKT7 et *EC WAK2*-PGBKT7 a été réalisé afin de vérifier l'absence de toute mutation ou décalage du cadre de lecture.

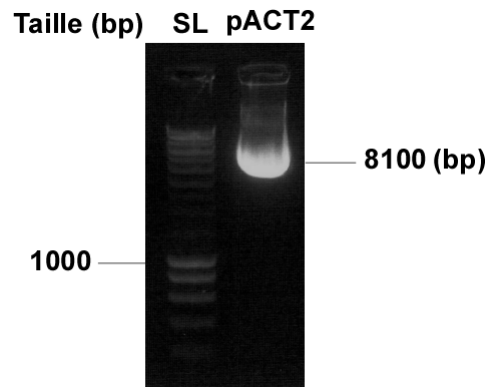


Figure 14. Migration sur gel d'agarose 1%-BET de 300 ng de la maxiprep du plasmide pACT2 possédant une taille de 8,1 Kb (SL : Smart Ladder, Eurogentec).

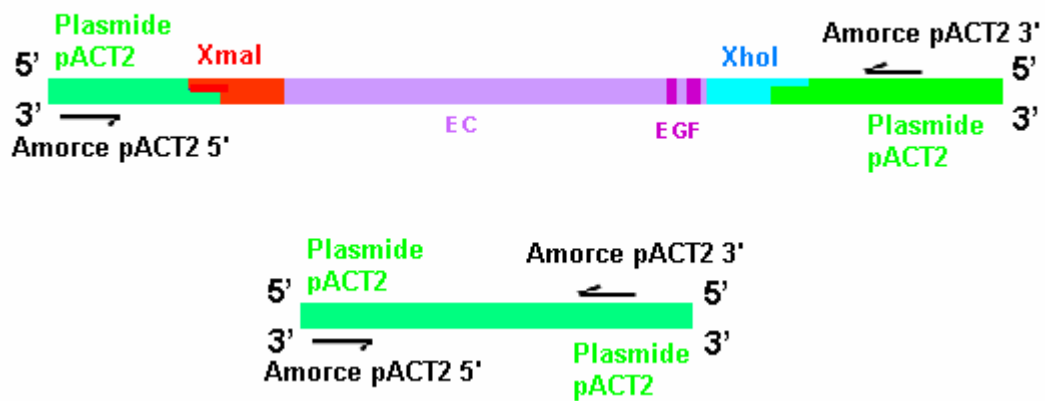


Figure 15. Schématisation de la construction *EC WAKs*-pACT2 avec la position des amorces pACT2 5' et pACT2 3' hybridées sur le plasmide pACT2.

## C. Clonage des *EC WAKs* dans le plasmide pACT2

Les séquences *EC WAK1* et *EC WAK2* ont également été clonées dans le plasmide pACT2. Des bactéries (*E. coli* Top10F') contenant le plasmide pACT2 ont été mises en culture pour réaliser une maxiprep afin de récupérer ce plasmide en grande quantité (Fig. 14). Le plasmide pACT2 a été restreint avec les enzymes XmaI et XhoI afin d'exciser les 16 bp du plasmide pACT2 (fragment restant de 8084 bp). Le produit de la restriction a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. L'ADN contenu dans la bande de 8084 bp a été extraite du gel sous transilluminateur UV et purifiée par nucléospin. La restriction et la purification des *EC WAKs* ont été réalisées selon le procédé décrit ci-dessus.

Les *EC WAK1* ou *EC WAK2* et pACT2 restreints ont ensuite été ligués par une T4 DNA ligase afin d'obtenir les constructions *EC WAK1*-pACT2 et *EC WAK2*-pACT2. Des *E. coli* (Top10 F') ont été par la suite transformées par choc thermique avec ces deux constructions. Un criblage PCR des colonies se développant sur milieu sélectif (Amp) avec des amorces spécifiques à pACT2 proches des sites d'insertion des *EC WAKs* a permis de discriminer les bactéries contenant les *EC WAKs* dans le plasmide par rapport à celles qui contiennent le plasmide vide (Fig. 15, 16A et B).

Un séquençage des constructions *EC WAK1*-pACT2 et *EC WAK2*-pACT2 a été réalisé afin de vérifier qu'il n'y a pas ni décalage de la phase de lecture, ni mutation.

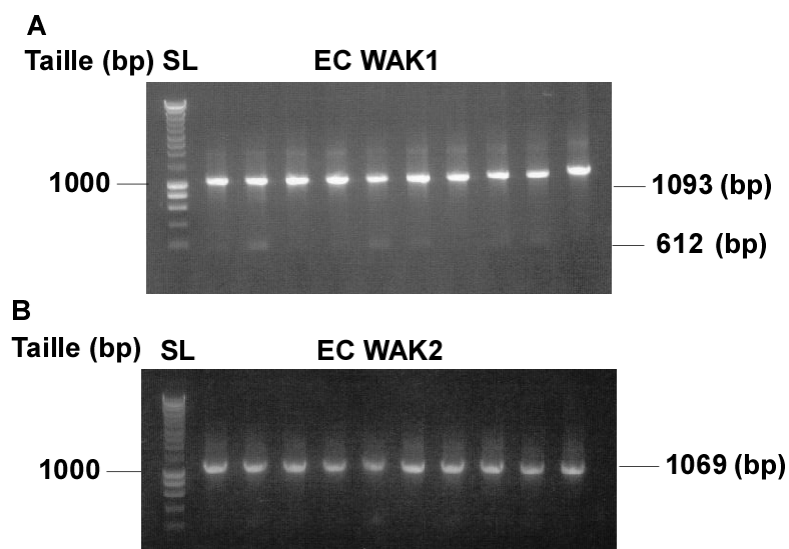


Figure 16. A. Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits du criblage par PCR sur colonies de bactéries (*E. coli* TOP10 F'). Chaque piste correspond à un clone testé. 1093 : *EC WAK1*; 612 : fragment de pACT2 obtenu en absence d'insert (SL : Smart Ladder, Eurogentec). B. Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits du criblage par PCR sur colonies de bactéries (*E. coli* TOP10 F'). Chaque piste correspond à un clone testé. 1069 : *EC WAK2* obtenu en absence d'insert (SL : Smart Ladder, Eurogentec).

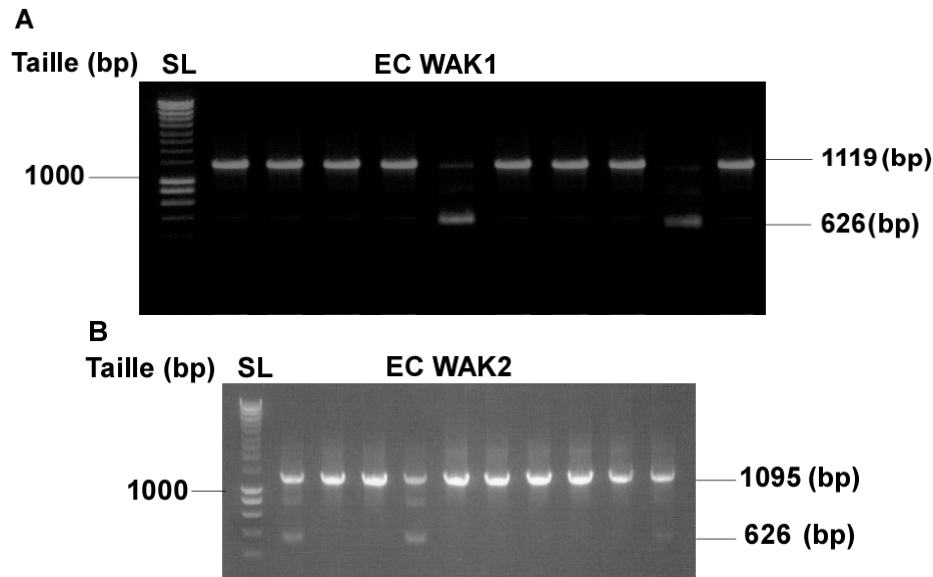


Figure 17. A. Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits du criblage par PCR sur colonies de levures MaV103. Chaque piste correspond à un clone testé. 1119 bp : *EC WAK1*; 626 bp : fragment de PGBKT7 obtenu en absence d'insert (SL : Smart Ladder, Eurogentec). B. Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits du criblage par PCR sur colonies de levures MaV103. Chaque piste correspond à un clone testé. 1095 bp : *EC WAK2*; 626 bp : fragment de PGBKT7 obtenu en absence d'insert (SL : Smart Ladder, Eurogentec).

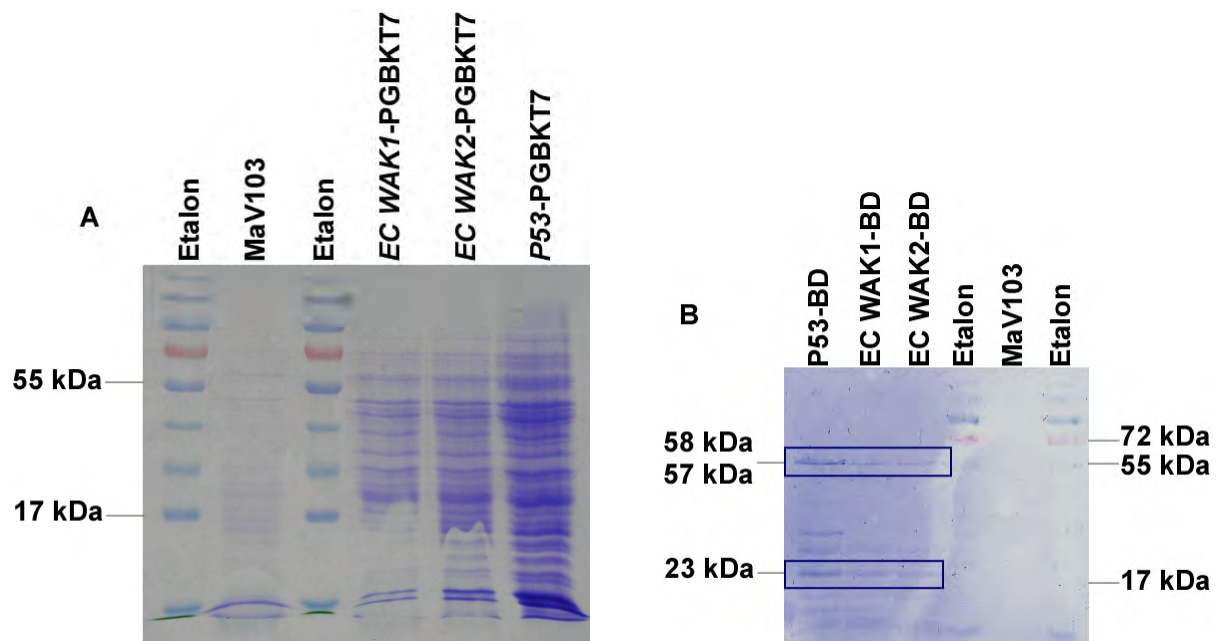


Figure 18. A : SDS-PAGE sur lysats totaux de MaV103 [vide]; MaV103 [*EC WAK1*-PGBKT7]; MaV103 [*EC WAK2*-PGBKT7] et MaV103 [*P53*-PGBKT7]. Révélation de la quantité de protéines totales extraites des levures MaV103, MaV103 [*EC WAK1*-PGBKT7], MaV103 [*EC WAK2*-PGBKT7] et MaV103 [*P53*-PGBKT7]. B : Western blot. *EC WAK1*-BD et *EC WAK2*-BD sont bien exprimés avec une taille respective de 58 et 57 kDa. Le contrôle positif présente une taille de 57 kDa. Aucune protéine n'est observée dans le contrôle négatif, MaV103. BD seul présente une taille de 23 kDa.

### **III. Co-transformations de MaV103 avec les constructions appât et proie**

#### **A. Transformations des MaV103 avec *EC WAKs*-PGBKT7**

##### **1. Transformation des MaV103**

Les levures MaV103 en phase exponentielle de croissance et rendues compétentes ont été transformées par choc thermique (méthode du LiAc) avec les plasmides *EC WAK1*-PGBKT7 et *EC WAK2*-PGBKT7 isolés de bactéries (*E. coli* TOP10F') par miniprep. Les levures se développant sur milieu synthétique complet déplété en tryptophane (sélection positive) ont été criblées par PCR avec les amorces PGBKT7/05/02 et PGBKT7 3'. La grande majorité des clones levuriens ainsi contrôlés contenait bien le plasmide PGBKT7 avec son insert, soit la protéine fusion d'intérêt *EC WAK1* ou *EC WAK2* (Fig. 17). Ces amorces s'hybrident sur le plasmide pour discriminer les levures qui contiennent le plasmide *EC WAK*-PGBKT7 de celles qui ne contiennent que le plasmide vide.

##### **2. Test d'expression des *EC WAKs*-BD**

La bonne expression des protéines *EC WAK1* et *EC WAK2* fusionnées au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p, dénommées *EC WAK1*-BD et *EC WAK2*-BD, a été vérifiées. Pour ce faire, un SDS-PAGE et un western blot avec un lysat total des souches MaV103 [*EC WAK1*-PGBKT7] et MaV103 [*EC WAK2*-PGBKT7] ont été réalisés. Un contrôle positif, MaV103 [*P53*-PGBKT7], et un contrôle négatif, MaV103 [vide] ont été inclus aux tests. La présence de protéines dans les différents échantillons a été contrôlée par SDS-PAGE avant de réaliser le western blot (Fig. 18A). Grâce au tag c-myc présent dans les protéines de fusion, un western blot a confirmé la bonne expression en levure des protéines d'intérêt *EC WAK1*-BD et *EC WAK2*-BD. Sur la figure 18B, *EC WAK1*-BD est présent avec un poids moléculaire de 58 kDa, *EC WAK2*-BD avec un poids moléculaire de 57 kDa et *P53*-BD avec un poids moléculaire de 57 kDa. Les domaines de liaison à l'ADN qui ne sont pas fusionnés avec *EC WAK* ont un poids moléculaire de 23 kDa.

Le test ayant confirmé la bonne expression des protéines de fusion pour les levures, l'étape suivante est de vérifier la non toxicité des protéines.



### 3. Test de toxicité des *EC WAKs*-PGBKT7

A ce stade, une vérification de l'éventuelle toxicité des protéines hybrides appâts *EC WAK1*-BD et *EC WAK2*-BD pour les levures *MaV103* fut indispensable. Si ces protéines s'avéraient être toxiques, les tests d'interaction pourraient être compromis. C'est pourquoi, la croissance en milieu riche non sélectif des levures *MaV103*, *MaV103* [*EC WAK1*-PGBKT7] et *MaV103* [*EC WAK2*-PGBKT7] a été évaluée sur une période de 26 heures. Les levures *MaV103* [vides] nous ont servi de contrôle positif; point de comparaison de leur croissance avec celle des *MaV103* préalablement transformées avec les plasmides *EC WAK1*-PGBKT7 ou *EC WAK2*-PGBKT7. Une préculture de 25 ml de milieu non sélectif de chaque souche de levure a été réalisée jusqu'à ce que celle-ci soit en phase exponentielle de croissance ( $DO_{600}$  de 0,6). Au temps 0, chaque préculture a été diluée dans du milieu non sélectif afin d'obtenir une  $DO_{600}$  de 0,1. L'absorbance de ces cultures a été mesurée toutes les deux heures afin d'estimer l'évolution de la croissance des clones levuriens. Les levures *MaV103* [*EC WAK1*-PGBKT7] et *MaV103* [*EC WAK2*-PGBKT7] présentent des courbes de croissance fortement similaires. Les levures *MaV103*, contrôle positif de croissance, semblent se développer légèrement moins bien que les clones exprimant les protéines appâts (Fig. 19). Par conséquent, aucune toxicité due à *EC WAK1*-BD et *EC WAK2*-BD affectant la croissance des levures *MaV103* ne semble entraver les tests d'interactions protéine-protéine étudiés lors de ce criblage double-hybride en levure.

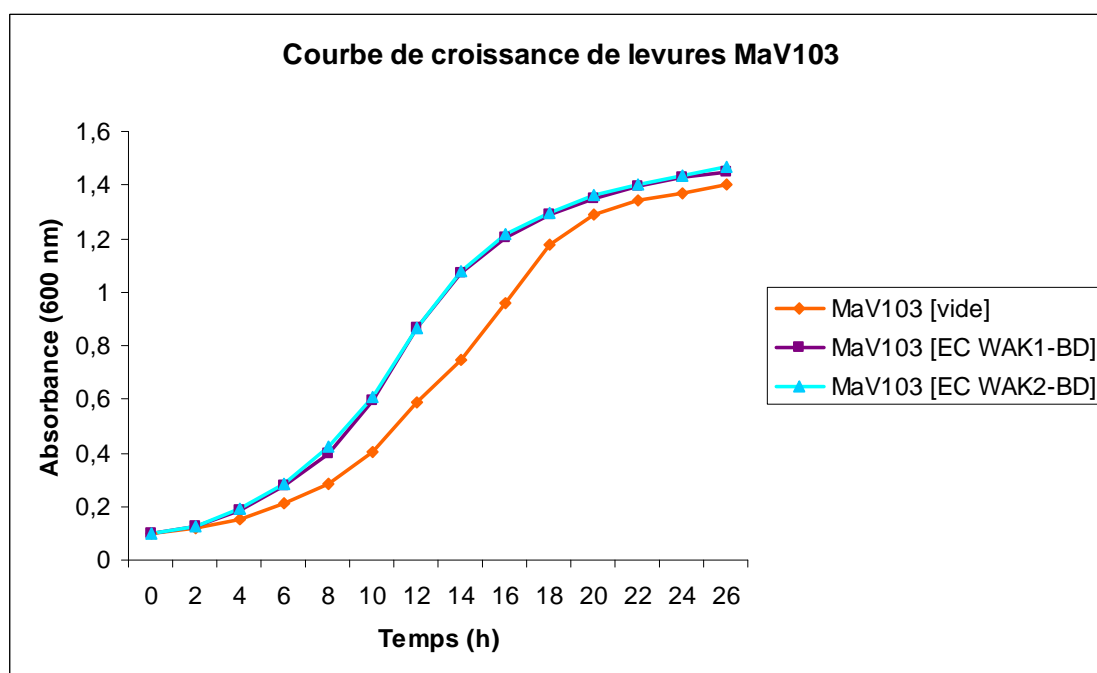


Figure 19. Courbe de croissance de levures *MaV103* [vide], *MaV103* [*EC WAK1*-PGBKT7] et *MaV103* [*EC WAK2*-PGBKT7]. Aucun retard de croissance des *MaV103* [*EC WAK1*-PGBKT7] et *MaV103* [*EC WAK2*-PGBKT7] n'est observé par rapport au *MaV103*, contrôle positif.

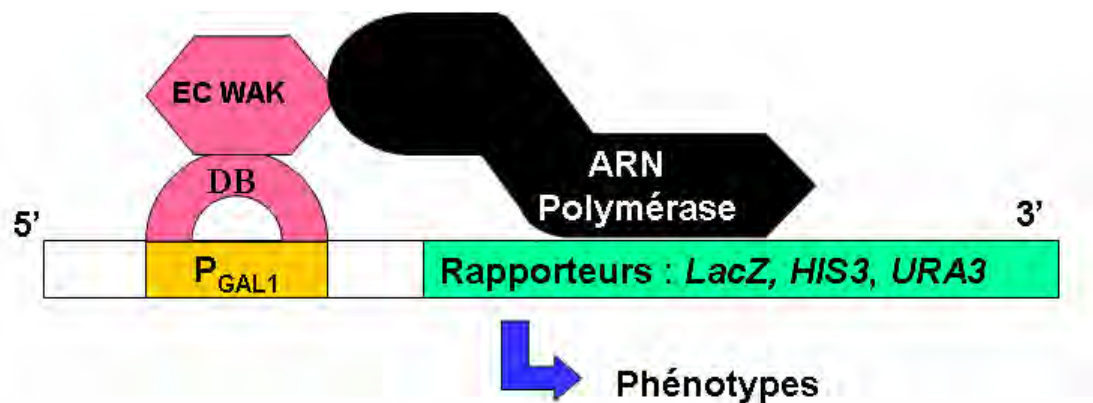


Figure 20. Représentation schématique de l'auto-activation dans l'hypothèse d'une activation de la transcription des gènes rapporteurs (*LacZ*, *HIS3* et *URA3*) par la protéine de fusion appât (EC WAKs-BD).

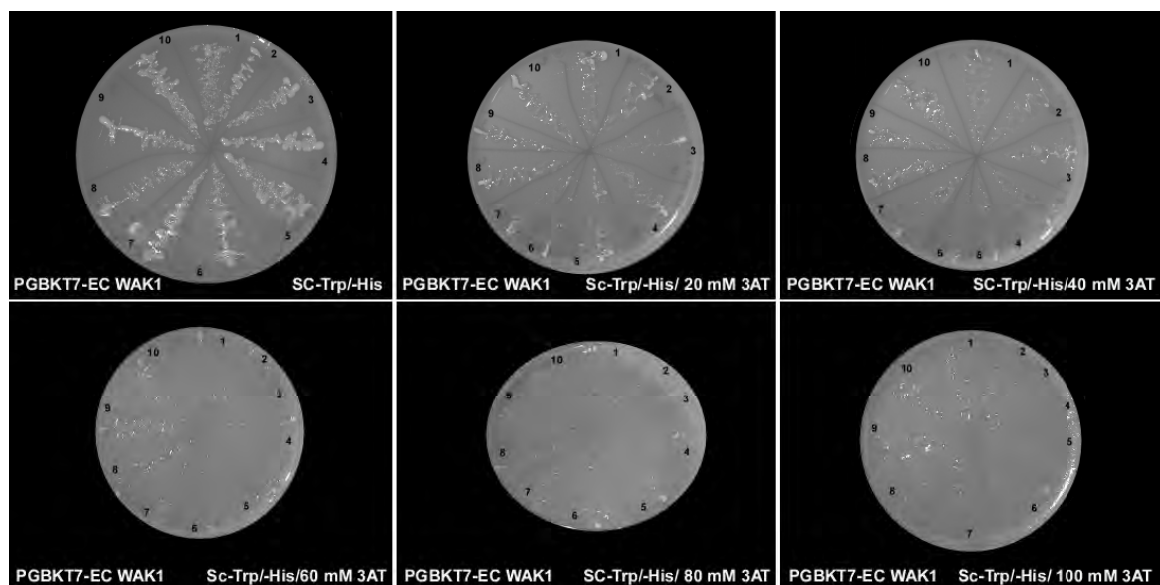


Figure 21. Tests d'auto-activation. 10 clones différents contenant *EC WAK1*-PGBKT7 sont déposés sur différents milieux sélectifs déplétés en tryptophane et en histidine avec des concentrations croissantes en 3AT. Ce test permet de déterminer la concentration de 3AT nécessaire pour supprimer les auto-activateurs. A partir de 40 mM de 3AT, les levures possédant uniquement le domaine de liaison à l'ADN lié à la protéine appât sont incapables de croître.

#### 4. Test d'auto-activation de la protéine appât fusionnée à BD

La transactivation est une activation de la transcription des gènes rapporteurs uniquement par une protéine appât (ici EC WAK) fusionnée au domaine de liaison à l'ADN, c'est-à-dire sans le domaine activateur de la transcription (Fig. 20). Des milieux sélectifs ne contenant ni histidine, ni tryptophane mais avec des concentrations croissantes de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) permettent de déterminer la concentration de 3AT nécessaire pour empêcher la croissance des levures. En effet, la croissance des levures traduit la capacité des EC WAKs-BD à activer la transcription des gènes rapporteurs dont *HIS3*. En effet, en absence de AD (domaine d'activation de la transcription), la protéine appât EC WAK fusionnée uniquement à BD (domaine de liaison à l'ADN), ne devrait pas conférer aux levures l'aptitude de survie sur un milieu de culture déplété en histidine puisque le gène rapporteur *HIS3* ne devrait pas être transcrit (Walhout *et al.*, 1999).

Ce test a donc consisté à repiquer 10 clones différents de MaV103 [*EC WAK1*- PGBKT7] et de MaV103 [*EC WAK2*- PGBKT7] sur des milieux sans histidine contenant des concentrations croissantes en 3AT (20, 40, 60, 80 et 100 mM) afin d'éliminer les transactivateurs. A partir d'une concentration de 40 mM de 3AT, les auto-activateurs sont éliminés dans ces deux souches de levures (Fig. 21 et 22).

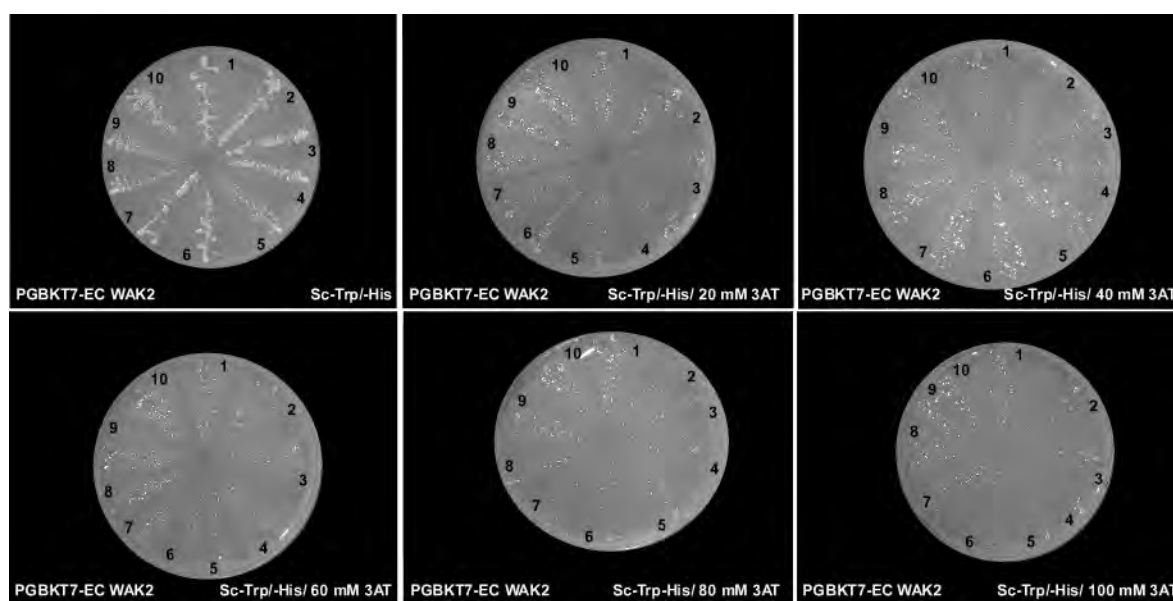


Figure 22. Tests d'auto-activation. 10 clones différents contenant *EC WAK2*-PGBKT7 sont déposés sur différents milieux sélectifs déplétés en tryptophane et en histidine avec des concentrations croissantes en 3AT. Ce test permet de déterminer la concentration de 3AT nécessaire pour supprimer les auto-activateurs. A partir de 40 mM de 3AT, les levures possédant uniquement le domaine de liaison à l'ADN lié à la protéine appât sont incapables de croître.

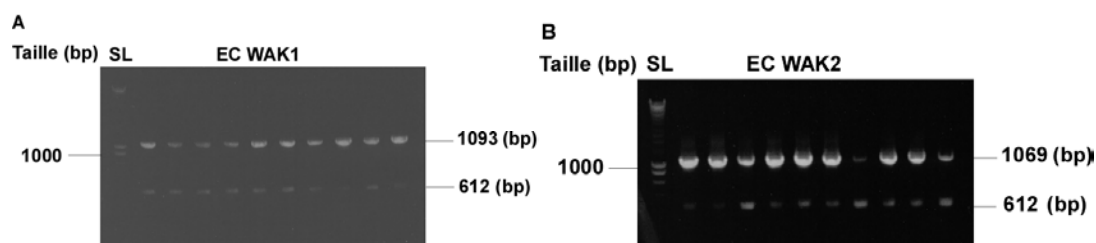


Figure 23. *A* : Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits du criblage PCR sur colonies de MaV103 [*EC WAK1*-PGBKT7]. Chaque piste correspond à un clone testé. 1093 bp : *EC WAK1*-pACT2; 612 bp : fragment de pACT2 obtenu en absence d'insert (SL : Smart Ladder, Eurogentec). *B* : Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits du criblage PCR sur colonies de MaV103 [*EC WAK1*-PGBKT7]. Chaque piste correspond à un clone testé. 1069 bp : *EC WAK2*-pACT2; 612 bp : fragment de pACT2 obtenu en absence d'insert (SL : Smart Ladder, Eurogentec).

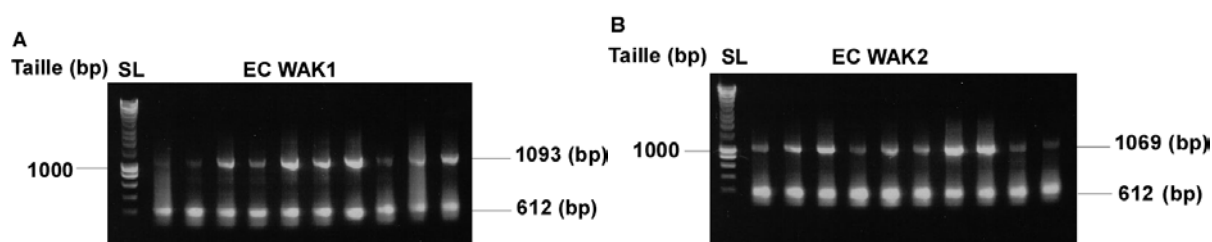


Figure 24. *A* : Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits du criblage PCR sur colonies de MaV103 [*EC WAK2*-PGBKT7]. Chaque piste correspond à un clone testé. 1093 bp *EC WAK1*-pACT2; 612 bp : fragment de pACT2 obtenu en absence d'insert (SL : Eurogentec). *B* : Migration sur gel d'agarose 1%-BET des produits du criblage PCR sur colonies de MaV103 [*EC WAK2*-PGBKT7]. Chaque piste correspond à un clone testé. 1069 bp : *EC WAK2*-pACT2; 612 bp : fragment de pACT2 obtenu en absence d'insert (SL : Smart Ladder, Eurogentec).

## B. Transformations des MaV103 [*EC WAKs-PGBKT7*] avec *EC WAKs-pACT2*

Ensuite, les levures MaV103 [*EC WAK1-PGBKT7*] sélectionnées sur milieu sélectif déplété en tryptophane et criblées positivement ont été transformées avec les constructions proies : *EC WAK1-pACT2* et *EC WAK2-pACT2* suivant la même méthode (LiAc-choc thermique) que ci-dessus. Le tableau ci-dessous (Tableau 1) reprend les différentes transformations réalisées.

Des levures MaV103 [*EC WAK1-PGBKT7*] et MaV103 [*EC WAK2-PGBKT7*] ont été transformées avec le plasmide pACT2 vide afin de vérifier que AD seule ne déclenche pas la transcription des gènes rapporteurs en présence des fusions appât-BD. Les levures MaV103 [*P53-PGBKT7/SV40-PGADT7*] ont servi de contrôle positif d'interaction puisque la protéine P53 murine interagit avec le fragment antigénique SV40.

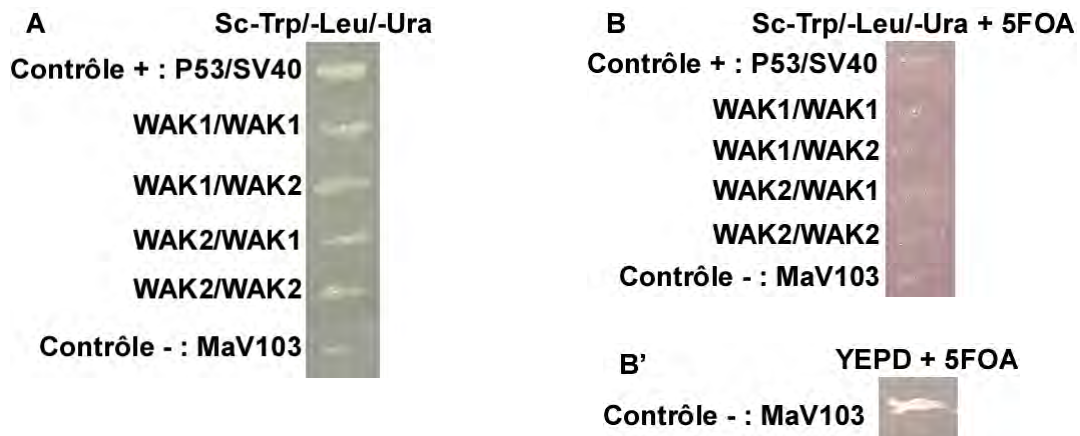
Ces levures transformées ont été étalées sur un milieu solide sélectif en tryptophane (pour conserver le plasmide PGBKT7) et en leucine (pour discriminer les levures MaV103 contenant le plasmide pACT2 de celles qui ne le contiennent pas). Après 3 jours de sélection, un criblage par PCR avec les amorces pACT2 5' et pACT2 3', a permis de confirmer la présence des constructions proies (*EC-WAK1-pACT2* et *EC WAK2-pACT2*) dans les levures (Fig. 23 et 24).

Les constructions présentes dans chaque souche de levures MaV103 ont été extraites afin de réaliser un séquençage et ainsi vérifier qu'il n'y a pas eu de mutation lors des différentes étapes de clonage.

La présence des deux plasmides dans les levures a été vérifiée par PCR sur des minipreps de celles-ci au moyen des amorces PGBKT7/05/02 et PGBKT7 3' pour le plasmide PGBKT7 et des amorces pACT2 5' et pACT2 3' pour le plasmide pACT2.

	Appâts	Proies	Souches de MaV103
Test d'interaction	<i>EC WAK1-PGBKT7</i>	<i>EC WAK1-pACT2</i>	Souche MaV103 [ <i>EC WAK1-PGBKT7/EC WAK1-pACT2</i> ]
	<i>EC WAK1-PGBKT7</i>	<i>EC WAK2-pACT2</i>	Souche MaV103 [ <i>EC WAK1-PGBKT7/EC WAK2-pACT2</i> ]
	<i>EC WAK2-PGBKT7</i>	<i>EC WAK1-pACT2</i>	Souche MaV103 [ <i>EC WAK2-PGBKT7/EC WAK1-pACT2</i> ]
	<i>EC WAK2-PGBKT7</i>	<i>EC WAK2-pACT2</i>	Souche MaV103 [ <i>EC WAK2-PGBKT7/EC WAK2-pACT2</i> ]
Contrôle négatif	<i>EC WAK1-PGBKT7</i>	emphy-pACT2	Souche MaV103 [ <i>EC WAK1-PGBKT7/emphy-pACT2</i> ]
	<i>EC WAK2-PGBKT7</i>	emphy-pACT2	Souche MaV103 [ <i>EC WAK2-PGBKT7/emphy-pACT2</i> ]
			Souche MaV103 [vide]
Contrôle positif	<i>P53-PGBKT7</i>	<i>SV40-PGADT7</i>	Souche MaV103 [ <i>P53-PGBKT7/SV40-PGADT7</i> ]

Tableau 1. Reprend toutes les transformations réalisées, en jaune, les différents tests d'interaction effectués ainsi que les contrôles négatifs et positif avec en vis-à-vis la nomenclature des souches de levures. Les tests d'interaction permettent de tester une interaction entre WAK1<sub>23-341</sub>, entre WAK2<sub>23-339</sub> et une interaction de WAK1<sub>23-341</sub> avec WAK2<sub>23-339</sub>.



**Figure 25. Tests d'interaction.** *A* : Sélection positive lors d'une interaction entre la protéine appât et proie (WAK1/WAK1; WAK1/WAK2; WAK2/WAK1; WAK2/WAK2; P53/SV-40). Tous les tests d'interaction sont positifs puisque les souches de levures se multiplient aussi bien que le contrôle positif. Comme il n'y a pas d'interaction dans la souche MAV103, contrôle négatif, elles ne se multiplient pas. *B* : Sur du milieu contenant du 5'FOA, les levures où il y a interaction meurent. Aucune souche de levures permettant de tester une interaction ne survit. *B'* : Les MaV103 se développent bien sur du milieu non sélectif contenant du 5'FOA.

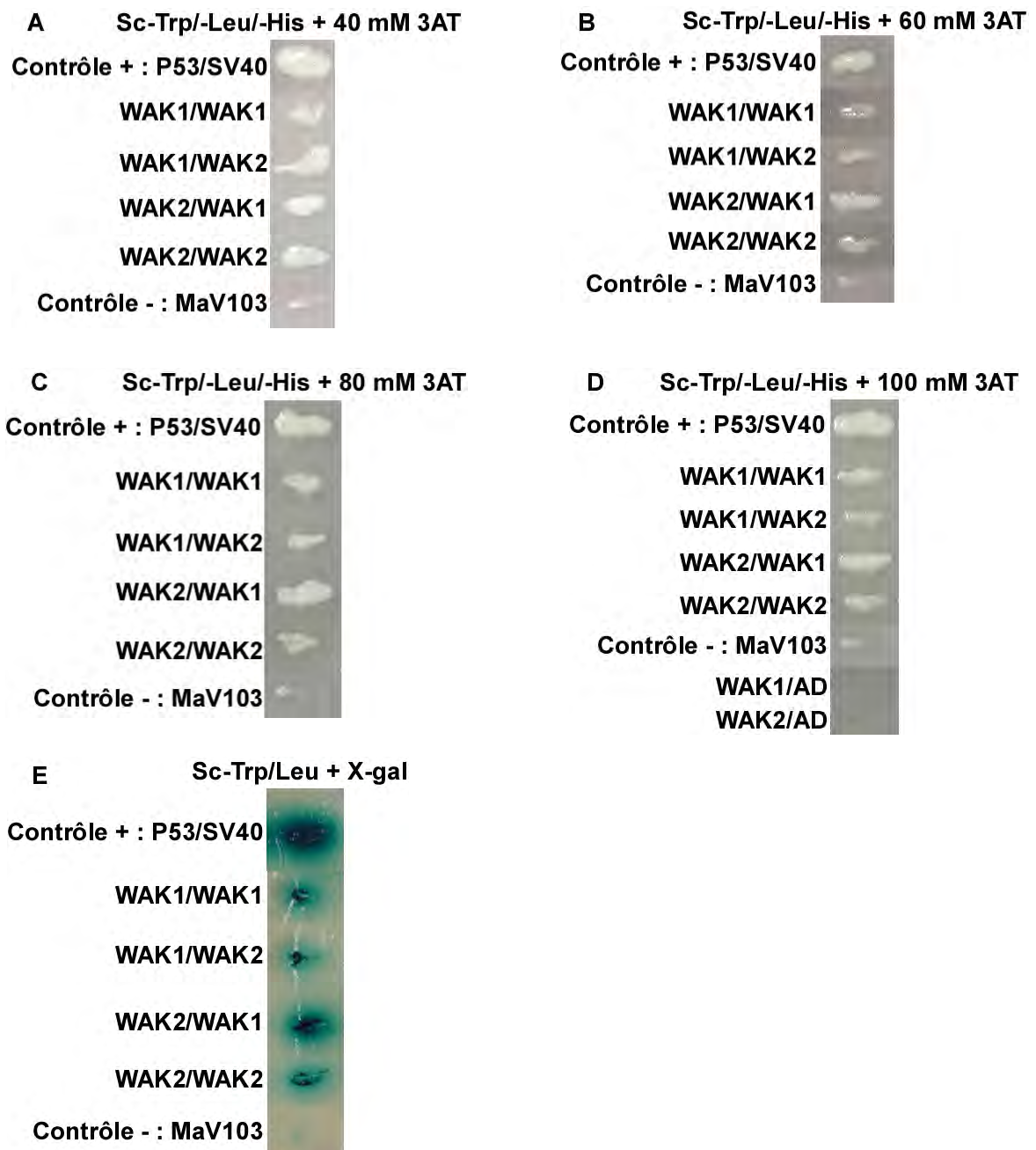
## IV. Tests d'interactions protéine/protéine

Des repiquages des clones levuriens, MaV103 [*EC WAK1-PGBKT7/EC WAK1-pACT2*], MaV103 [*EC WAK1-PGBKT7/EC WAK2-pACT2*], MaV103 [*EC WAK2-PGBKT7/EC WAK1-pACT2*] et MaV103 [*EC WAK2-PGBKT7/EC WAK2-pACT2*], sur milieux déplétés en -Trp/-Leu/-His ou -Ura, supplémentés de X- $\alpha$ -gal, ou de 5'FOA ont été réalisés afin de confirmer toute interaction entre WAK1<sub>23-341</sub>, entre WAK2<sub>23-339</sub>, entre WAK1<sub>23-341</sub> et WAK2<sub>23-339</sub>. Les différents milieux sélectifs (Sc-Trp/-Leu/-Ura, Sc-Trp/-Leu + 5'FOA, Sc-Trp/-Leu/-His + 40 mM 3AT, Sc-Trp/-Leu/-His + 60 mM 3AT, Sc-Trp/-Leu/-His + 80 mM 3AT, Sc-Trp/-Leu/-His + 100 mM 3AT et Sc-Trp/-Leu/-His + X-gal) ont permis la confirmation de l'expression des 3 gènes rapporteurs *LacZ*, *Ura3* et *His3* dans le cas d'interaction protéine-protéine. Des MaV103 [vides] ont été utilisées comme contrôle négatif et des MaV103 [*p53-PGBKT7* et *SV40-pGADT7*] comme contrôle positif.

Le gène *URA3* présent dans le génome des levures souche MaV103 permet des sélections négative et positive. *URA3* encode l'orotidine-5'phosphate décarboxylase, une enzyme requise pour la biosynthèse de l'uracile. La sélection positive est possible par complémentation auxotrophique de la mutation *ura3*. En effet, la levure MaV103 étant hétérozygote, elle possède une copie *ura3* (mutée) ainsi qu'une copie *URA3* sauvage, permettant la survie des levures sur milieu sans uracile sous contrôle du promoteur *GAL1*. Lors d'une interaction entre l'appât et la proie, les domaines de liaison et d'activation du facteur de transcription Gal4p sont physiquement proches, reformant ainsi un facteur de transcription actif initiant la transcription de *URA3* permettant l'auxotrophie des levures sur milieu sélectif (Sc-Trp/-Ura) déplété en uracile. La croissance sur milieu Sc-Trp/-Leu/-Ura des levures MaV103 [*EC WAK1-PGBKT7/EC WAK1-pACT2*], des MaV103 [*EC WAK1-PGBKT7/EC WAK2-pACT2*], des MaV103 [*EC WAK2-PGBKT7/EC WAK1-pACT2*] et des MaV103 [*EC WAK2-PGBKT7/EC WAK2-pACT2*] est aussi importante que pour le contrôle positif, MaV103 [*p53-PGBKT7* et *SV40-pGADT7*] (Fig. 25A). Par conséquent, ce test révèle une possible interaction entre EC WAK1/EC WAK1; EC WAK1/EC WAK2; EC WAK2/EC WAK1 et EC WAK2/EC WAK2.

La sélection négative, quant à elle, est basée sur un inhibiteur spécifique, l'acide 5-fluororotique (5'FOA) qui empêche la croissance de levures où il n'y a aucune interaction entre appât et proie; c'est-à-dire où le gène *ura3* n'est pas complémenté par *URA3*. Par conséquent, seules les levures MaV103 [vides] seront capables de croître sur ce milieu. Les levures *ura3*<sup>-</sup> peuvent être sélectionnées positivement sur un milieu contenant le 5'FOA. Les cellules *URA3*<sup>+</sup> sont tuées parce que 5'FOA est converti en un composé toxique, le 5-fluorouracile, par l'action de l'orotidine-5'phosphate décarboxylase, alors que les cellules *ura3*<sup>-</sup> sont résistantes puisqu'elles ne produisent pas ce composé. La sélection négative sur milieu 5'FOA est hautement discriminative, et habituellement moins de 10<sup>-2</sup> colonies 5'FOA résistantes sont *URA3*<sup>+</sup> (Walhout *et al.*, 2001). Les différentes souches de levures ont été repiquées sur un milieu sélectif avec 2 % de 5'FOA. Toutes les souches de levures se développant sur un milieu déplété en Trp/-Leu/-Ura (donc, où il y a une interaction protéine-protéine potentielle) n'ont pas survécu sur le milieu complémenté en 5'FOA. Par contre les MaV103 [vides] (négatif d'interaction et donc positif de croissance sur ce milieu) se multiplient correctement (Fig. 25B et B').

Comme déjà abordé, le 3AT est utilisé à des concentrations supérieures à 40 mM afin de supprimer les transactivateurs et de révéler les vrais interactants. Les différentes souches de levures ont été repiquées sur un milieu sélectif déplété en tryptophane, leucine et histidine



**Figure 26.** *A*: Sélection positive lors d'une interaction entre la protéine appât et proie (WAK1/WAK1; WAK1/WAK2; WAK2/WAK1; WAK2/WAK2; P53/SV-40). La concentration de 3AT est le seuil minimal permettant d'éliminer les auto-activateurs. Toutes les souches sont capables de croître. *B*: Des sélections positives via des concentrations croissantes de 3AT de 60 mM, *C*: 80 mM, *D*: 100 mM, augmentent la pression de sélection. Les souches permettant de tester une interaction entre WAK1/WAK1; WAK1/WAK2; WAK2/WAK1; WAK2/WAK2 et P53/SV-40 ce sont bien développée sur ces différents milieux contrairement au contrôle négatif, testant une interaction entre EC WAK-BD et AD seul. Ces contrôles négatifs ont été repiqués par repiquage velours. *E*: Test *LacZ* permettant de révéler de manière colorimétrique une interaction entre la protéine appât et proie. Chaque souche de levure testée pour une interaction présente une forte intensité de bleu. Dans toutes les sélections positives, MaV103 vide est incapable de croître.

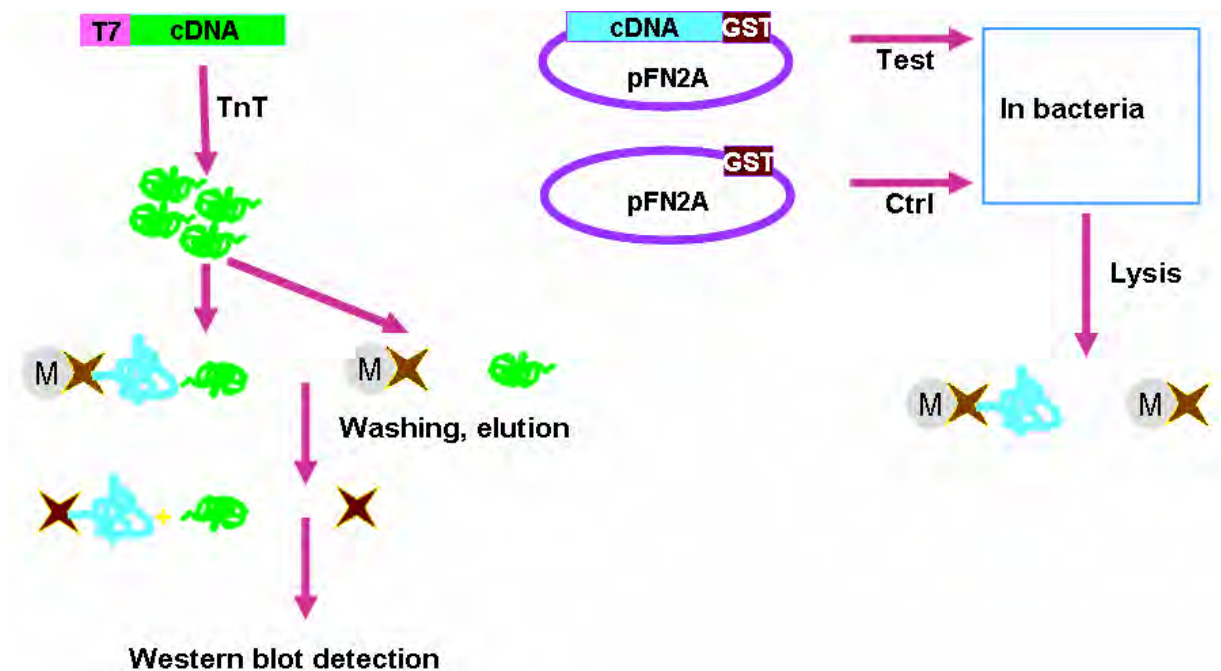


avec des concentrations de 3AT de 40 mM, 60 mM, 80 mM et 100 mM. La croissance des levures MaV103 [*EC WAK1-PGBKT7/EC WAK1-pACT2*], des MaV103 [*EC WAK1-PGBKT7/EC WAK2-pACT2*], des MaV103 [*EC WAK2-PGBKT7/EC WAK1-pACT2*] et des MaV103 [*EC WAK2-PGBKT7/EC WAK2-pACT2*] est aussi importante que pour le contrôle positif, MaV103 [*P53-PGBKT7* et *SV40-pGADT7*] dans chaque milieu (Fig. 26A, B, C, D). Par conséquent, ce test révèle une possible interaction entre EC WAK1/EC WAK1; EC WAK1/EC WAK2; EC WAK2/EC WAK1; EC WAK2/EC WAK2. Sur la figure 26D, deux contrôles négatifs supplémentaires, permettant de tester une éventuelle interaction entre EC WAK1 ou EC WAK2 avec le domaine activateur de la transcription seul (AD), sont représentés. Ces deux souches de levures ne sont pas capables de croître sur ce milieu. Par conséquent, il n'existe pas d'interaction entre EC WAK1 ou EC WAK2 avec AD seul.

Le gène *lacZ*, encodant la  $\beta$ -galactosidase, est le rapporteur le plus communément utilisé parce que son activité peut être mise en évidence semi-quantitativement par tests colorimétriques. En effet, puisque l'hydrolyse du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside (X-gal) par la  $\beta$ -galactosidase produit un précipité bleu, il est possible d'établir une corrélation entre l'intensité de bleu et l'intensité de l'interaction de la protéine appât avec la protéine proie. Lorsqu'il n'y a pas d'interaction entre ces deux protéines, les levures restent blanches. Les différentes souches de levures ont été étalées sur un milieu sélectif en tryptophane ainsi qu'en leucine mais supplémenté de 2 % de X-gal. Après trois jours de cultures à 30°C, une forte intensité de bleu a été observée pour chaque souche contenant des protéines interactantes d'intérêts potentielles. Le contrôle négatif a été, quant à lui, blanc (Fig. 26E).

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus laisse supposer des homodimérisations de EC WAK1, de EC WAK2, et une hétérodimérisation de WAK1 avec WAK2 même si ces résultats doivent être confirmés *in vitro* par une technique telle que le GST Pull Down Assay.

# **Conclusions et Perspectives**



**Figure 1. GST-Pull Down Assay.** Le plasmide pFN2A contenant des séquences codant pour la protéine appât fusionnée à un tag GST et le vecteur vide sont insérés en bactérie. Après lyse des bactéries, le GST de la protéine permet sa liaison avec des particules magnetiques contenant GSH. En parallèle avec ceci, les séquences codant pour les protéines proies sont sous le contrôle d'un promoteur T7. Cette construction est mélangée avec un mastermix permettant la transcription/traduction in vitro. Les billes liées à la protéine appât sont mises en contact avec la protéine proie. Après une série de lavage, les protéines sont éluées. S'il y a interaction, la protéine proie ne s'éluera pas au lavage et elle sera mise en évidence par western blot. La détection par western blot est possible parce que pendant l'étape de transcription traduction, une enzyme a ajouté de la biotine sur les lysines permettant une reconnaissance à l'aide de l'anticorps anti-streptavidine couplé à la phosphatase alcaline.

De part leur localisation transmembranaire, les WAKs constituent potentiellement des récepteurs senseurs de l'intégrité de la paroi cellulaire. La liaison de WAK1 à des OGAs de  $DP \geq 9$ , pouvant être produits lors d'une infection pathogène, laisse penser que WAK1 serait capable d'initier une voie de transduction du signal suite à une attaque pathogène.

La majorité des RLKs, dont les WAKs, sont toujours actuellement doublement orphelins, c'est-à-dire que ni le ligand extracellulaire, ni le premier interactant intracellulaire ne sont connus. Cependant, de nombreuses études relatives au fonctionnement de ces récepteurs ont permis, du moins pour l'instant, de montrer qu'ils doivent homo- ou hétérodimériser pour déclencher leur voie de transduction du signal.

L'objectif principal de ce mémoire était d'étudier les possibles homo-hétérodimérisations inter et intra WAKs. Pour ce faire, notre première démarche expérimentale fut de cloner en bactérie puis en levure les séquences codant pour les domaines extracellulaires complets, des WAKs, excepté le peptide signal. Le clonage en bactérie a permis, d'une part, de fusionner ces domaines extracellulaires des WAKs avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4p et, d'autre part, de les fusionner avec le domaine activateur de la transcription de ce même facteur de transcription. Après un contrôle par séquençage des constructions, des tests double-hybrides avec appât et proie connue, ont été réalisés. Avant d'effectuer les tests d'interactions intra et inter domaines extracellulaires de WAK1 et de WAK2, la non toxicité de l'expression de *EC WAK1* et 2 pour la souche de levure MaV103, la bonne expression des protéines *EC WAK1* et *EC WAK2* par western blot ainsi que la non-autoactivation de la transcription des gènes rapporteurs par les protéines de fusion *EC WAK1-BD* et *EC WAK2-BD* ont été contrôlés. Il s'est avéré que *EC WAK1* et *EC WAK2* n'étaient pas toxiques pour les levures et étaient bien exprimés. Nous avons mis en évidence qu'il était nécessaire d'avoir une concentration supérieure à 40 mM de 3AT pour éliminer tous les transactivateurs.

Les tests double-hybrides en levure avec *EC WAK1* et *EC WAK2* comme appât et/ou proie, ont permis de mettre en évidence une potentielle interaction de *EC WAK1* avec *EC WAK2*, ainsi que des potentielles interactions de *EC WAK1* et *EC WAK2*. Ces interactions protéines-protéines ont été évaluées sur différents milieux sélectifs par tests de survie, via les gènes rapporteurs *URA3* et *HIS3*, par test de mort, via le gène rapporteur *URA3*, et par test colorimétrique via le gène *LacZ* des levures suite à l'activation de la transcription de gènes rapporteurs induite par une interaction entre la protéine appât et la protéine proie.

Actuellement, afin de confirmer les résultats du double hybride, des tests *in vitro* d'interaction protéine-protéine de type GST-Pull Down Assay sont réalisés (Fig. 1). Les clonages de *EC WAK1* et *EC WAK2* ont d'abord été réalisés pour les fusionner à la GST. Pour réaliser le GST-Pull Down Assay, les protéines *EC WAK1*-GST, *EC WAK2*-GST, *EC WAK1* et *EC WAK2* ont été transcrites et traduites *in vitro* en utilisant des ARNt biotinylés. Le GST Pull Down Assay utilise des particules magnétiques qui permettent l'immobilisation des protéines appâts fusionnées à la GST. Ensuite, les protéines proies sont ajoutées et après lavages, et élution, un western blot en condition dénaturante avec un anticorps streptavidine devrait permettre de confirmer les interactions protéine-protéine identifiées en double hybride. Des mises au point concernant les étapes de transcription et de traduction *in vitro* avec incorporation de lysines biotinylées dans ces protéines de fusions sont réalisées actuellement.

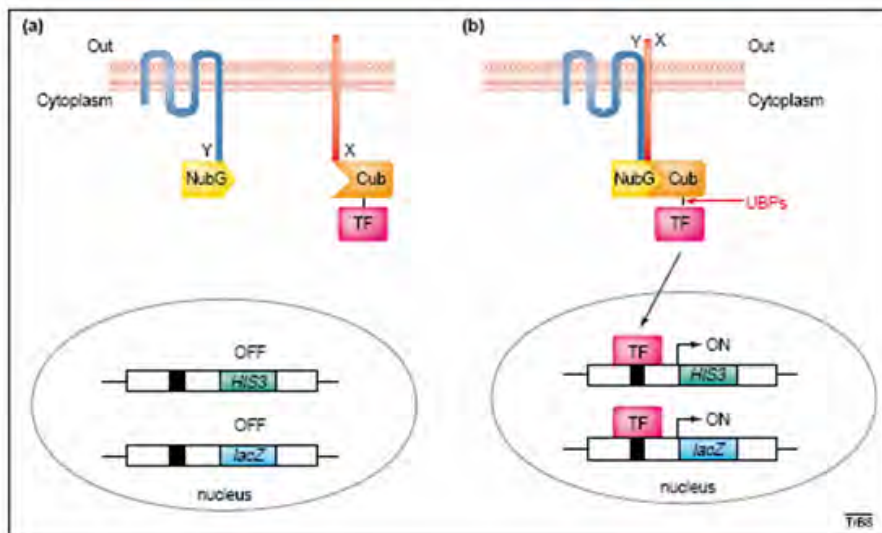


Figure 2. Le système Split-ubiquitin permet d'étudier des interactions entre protéines membranaires (Stagliar and Fields, 2002). L'ubiquitine est scindée afin d'obtenir une partie C-terminale (Cub) et une partie N-terminale (Nub). Cub est fusionné avec un facteur de transcription (TF) et avec la protéine appât. Nub est, quant à lui, fusionné à la protéine proie. S'il y a interaction entre la protéine appât et la protéine proie, l'ubiquitine reconstituée va ubiquitiner le TF. Des protéases ubiquitines spécifiques (UBPs) vont couper le lien entre Cub et TF qui va se diriger vers le noyau pour activer la transcription de gènes rapporteurs.

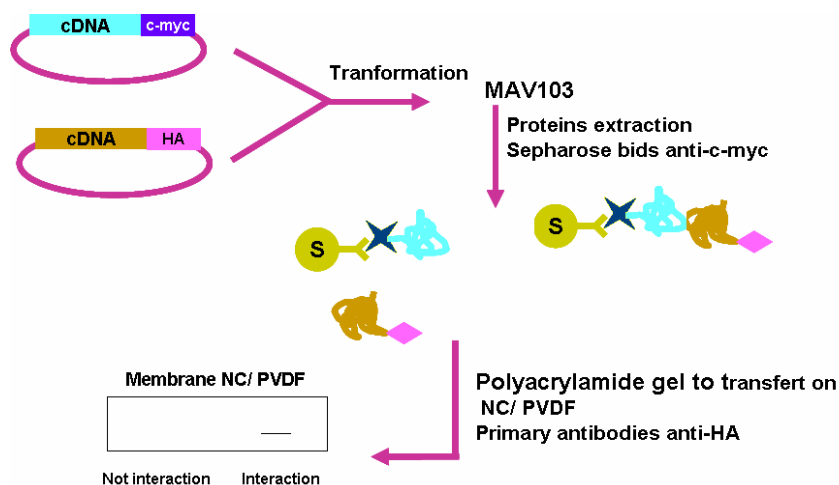


Figure 3. Co-Immunoprécipitation. La séquence codant pour la protéine amorçe est fusionnée à un tag c-myc et la séquence codant pour la protéine proie est fusionnée à un tag hémagglutinine. Des levures MAV103 sont transformées avec ces deux plasmides. Après avoir laissé le temps aux levures de produire ces protéines, les protéines sont extraites. Après extraction, le lysat de protéine est passé dans une colonne contenant des billes de sépharose avec l'anticorps reconnaissant le premier tag. La révélation du deuxième tag se fait par Western blot.

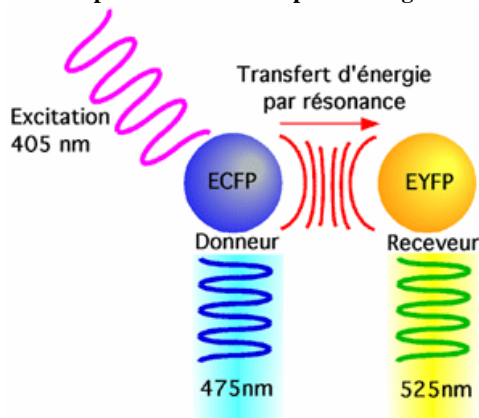


Figure 4. Lorsque le fluorophore donneur est excité à une longueur d'onde de 405 nm, par exemple, il transfère son énergie par résonance au fluorophore accepteur qui émettra de la fluorescence à 525 nm si et seulement si les deux fluorophores sont proches.

Cette technique permet de mettre en évidence une interaction à partir du moment où les deux protéines interactantes présentent des poids moléculaires suffisamment différents que pour être discernables par western blot puisque celui-ci révélera les protéines appât et proie. Cependant, le fait que EC WAK1 et EC WAK2 présentent approximativement la même taille, nous empêche de savoir s'il y a bien interaction avec une révélation à la streptavidine. La protéine proie pourrait alors être révélée avec son tag c-myc. En effet, lorsqu'il n'y a pas d'interaction entre les protéines appât et proie, la protéine proie est éliminée lors des différents lavages. Dans ce cas, aucune bande protéique n'apparaîtra lors du western blot. Pour vérifier si le résultat est fiable, c'est-à-dire être certain qu'il n'y a pas eu de problème pendant la manipulation puisque aucune bande protéique n'apparaît, il faudrait réaliser en parallèle un autre western blot qui révèle les protéines appât et proie, la protéine appât étant toujours présente.

A court terme, le développement de techniques telles que la co-immunoprécipitation ou le far western blot pourrait être envisagé. La technique de co-immunoprécipitation nécessite la présence de deux tags différents, un sur chaque protéine (Fig. 2). Dans nos constructions pour la réalisation du double hybride, les protéines de fusion contiennent un tag c-myc sur la protéine appât (EC WAK-BD) et un tag hémagglutinine (HA) sur la protéine proie (EC WAK-AD). Cependant, un promoteur T7 est nécessaire pour pouvoir transcrire et traduire nos protéines *in vitro*. Ce promoteur n'est pas présent sur le plasmide pACT2, permettant la production de la protéine proie. Mais, lors de la réalisation du GST-Pull Down Assay, les protéines proies ont été insérées dans le plasmide pFN2A pour être sous le contrôle du promoteur T7. Ce plasmide permet aussi de fusionner les protéines proies à un épitope Xpress. Comme les protéines appât et proie contiennent un tag différent et que leur expression est bien sous le contrôle du promoteur T7, toutes les conditions nécessaires à la réalisation de la co-immunoprécipitation sont réunies. La quantité de protéines produites par le système TNT n'est peut être pas suffisante pour la réalisation de cette technique. Une solution envisagée peut être l'utilisation d'un promoteur inductible permettant de surexprimer les *EC WAKs* dans les levures avant d'extraire les protéines. Le far western blot permet une identification précise de la protéine interactante par MALDI TOF.

A moyen terme, des études *in vivo* (en cellules ou protoplastes) ou *in planta* (en plantes) seraient à planifier. Dans l'optique de telles études, deux techniques peuvent être envisagées : le FRET et BiFC.

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est une technique qui permet de visualiser une interaction entre deux protéines. Dans cette technique, un transfert d'énergie d'un fluorophore donneur vers un fluorophore accepteur proche entraîne une émission de fluorescence du fluorophore accepteur. Ceci est possible parce que la longueur d'onde d'émission du fluorophore donneur correspond à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore accepteur. Comme ces deux fluorophores sont génétiquement fusionnés aux deux protéines d'intérêt, s'il y a interaction entre ces deux protéines, elles seront suffisamment proches pour qu'il y ait émission de fluorescence. Ce système peut être utilisé en protoplaste et en plante (Immink *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2008).

Maintenant que nous avons montré qu'il y avait interaction entre EC WAK1, entre EC WAK2 et entre EC WAK1 avec EC WAK2, il serait intéressant d'étudier la région responsable de cette interaction. Pour ce faire, nous pourrions réduire progressivement la taille des séquences codant pour le domaine extracellulaire des WAKs afin de découvrir quelle portion est responsable de ces interactions. Cependant, nous supposons que celles-ci sont dues à la présence du domaine EGF, reconnu comme étant impliqué dans l'interaction de type protéine-protéine. Par ailleurs, ce domaine pourrait aussi forcer les interactions que nous avons mises en évidence. Il serait donc intéressant de tester s'il y a interaction entre EC WAK et une autre protéine contenant un domaine EGF. Une fois que la région responsable de ces interactions a été définie, différentes mutations pourraient être insérées afin d'obtenir une forte diminution de la croissance des levures, celle-ci étant significative d'une interaction entre la protéine proie et appât.

Ces protéines mutées pourraient servir de contrôle pour la réalisation d'un système de complémentarité de fluorescence bimoléculaire (BiFC), permettant de visualiser *in vivo* des interactions protéine-protéine par reconstitution de la protéine fluorescente jaune, en protoplastes. La partie C-terminale de la protéine de fluorescence jaune (YFP) est fusionnée à la protéine appât (YFPC) et la partie N-terminale de YFP à la protéine proie (YFPN). Par conséquent, lorsqu'il y a interaction entre la protéine appât et proie, la protéine YFP sera reconstituée et il y aura émission de fluorescence jaune (Kim *et al.*, 2007). Pour chaque interaction montrée par double hybride, la protéine appât (YFPC) est testée avec la protéine proie (YFPN), avec la protéine proie mutée (YFPC) et avec le domaine N-terminale de YFP (YFPN). La protéine proie (YFPN) est testée avec le domaine C-terminale de YFP (YFPC). Ainsi l'intensité de la fluorescence pourra être appréciée en fonction d'un gradient d'intensité de fluorescence où l'interaction avec simplement YFP présente une fluorescence presque nulle, l'interaction avec la protéine mutée présente une fluorescence faible et l'interaction avec la protéine sauvage présente une forte fluorescence (Walter *et al.*, 2004).

La dernière étape, la plus importante, serait de tester l'interaction des EC WAKs en plante par la technique BiFC. Cette étape permettra d'être dans des conditions qui reflètent l'environnement normal physiologique. Les différents tests d'interaction réalisés sur protoplaste pourraient être réalisés en plante. Agrobactérium pourrait être utilisé pour transformer les plantes avec les différentes constructions. La bonne expression des protéines sera vérifiée par western blot. Ainsi, effectuant des tests d'interaction en levure, en protoplaste et en plante, la reproductibilité des résultats pourra être appréciée sachant que dans l'organisme à l'autre, nous nous rapprochons des conditions naturelles des WAKs (Walter *et al.*, 2004).

En ce qui concerne l'éventuelle homo-hétérodimérisation entre WAKs, il serait intéressant de déterminer si une liaison du ligand pectique en conformation egg-box pourrait favoriser une dimérisation plus intense entre WAKs. La technique du split-ubiquitine en levures, où les protéines de fusion sont sécrétées en membrane, pourrait dans ce cas s'avérer être une alternative au double-hybride (Fig. 3). L'interaction entre deux protéines membranaires est détectée par clivage protéolytique d'une protéine de fusion. Le clivage libère un facteur de transcription, qui active l'expression de gènes rapporteurs dans le noyau. L'interaction peut ainsi être analysée par test colorimétrique (Stagljar and Fields, 2002). L'addition de pectines en conformation egg box dans le milieu de culture des levures pourrait être envisagée. L'interaction entre les protéines appât et proie pourrait être confirmée par la

méthode traditionnelle de l'expression des gènes rapporteurs. Elle pourrait aussi être confirmée en utilisant du glutaraldéhyde pour stabiliser les ponts disulfures, souvent présents lors d'une dimérisation, extraire les protéines de levures et révéler, de façon non dénaturante, cette interaction à l'aide d'un tag présent sur la protéine proie (Decreux, 2006). Pour confirmer le fait que ce soit bien la pectine qui engendre cette dimérisation, des levures transformées ne seront pas en contact avec la pectine. Le pH 5,9 du milieu de culture coïncide avec le pH nécessaire à l'obtention d'une conformation en egg box des pectines. Un ratio d'ions monovalents et bivalents doit être respecté pour l'obtention de cette conformation. L'un ou l'autre peuvent être ajoutés dans le milieu afin d'obtenir un ratio correct (Decreux, 2006). Cette expérience permettra tout d'abord de comparer les tests d'interaction, réalisés dans le noyau des levures, des domaines extracellulaires des WAKs avec les tests réalisés avec les protéines WAKs entières et exprimées en membrane. Ensuite, elle permettra d'analyser l'effet du ligand, les pectines dans une conformation egg box, sur l'homo- ou hétérodimérisation des WAKs.

La conformation d'une protéine liée à son ligand est légèrement différente de celle de la protéine native. Il serait donc intéressant d'obtenir des WAKs liés à la pectine afin de réaliser des tests d'interactions. Pour ce faire, un couplage biotine-avidine pourrait être utilisé. La biotinylation serait réalisée en mettant en présence l'ester de la N-hydroxysuccinimide biotine. Les WAKs pourraient être liés à l'avidine via une liaison amine. Comme la pectine interagit avec WAK, la biotine se fixerait à la streptavidine puisqu'elles sont suffisamment proches. Par conséquent, WAK serait lié à la pectine. Seulement, ce procédé n'est pas réalisable avec des pectines, il n'est valable que pour des interactions de type protéine-protéine (Pierce Protein Research Products).



# Références bibliographiques

**Albersheim and Valent** (1978). "Host-pathogen interactions in plants. Plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics". J. Cell Biol. 78: 627-43.

**Anderson, Wagner *et al.*** (2001). "WAKs: cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix". Plant Molecular Biology 47: 197-206.

**Aziz, Gauthier *et al.*** (2007). "Elicitor and resistance-inducing activities of  $\beta$ -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with  $\beta$ -1,3 glucans and  $\alpha$ -1,4 oligogalacturonides". Journal of Experimental Botany 1-10.

**Azpiroz, Wu *et al.*** (1998). "An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation". Plant Cell 10: 219-230.

**Baker, Zambryski *et al.*** (1997). "Signaling in plant-microbe interactions". Science 276: 726-733.

**Bariola, Retelska *et al.*** (2004). "Remorins form a novel family of coiled coil-forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plants". Plant Molecular Biology 55: 579-594.

**Becraft** (2002). "Receptor kinase signaling in plant development". Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 18: 163-192.

**Bishop, Pearce *et al.*** (1984). "Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato leaves. Identity and activity of poly-and oligogalacturonide fragments". J. Biol. Chem. 259: 13172-113177.

**Blanco, Garretón *et al.*** (2005). "Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in *Arabidopsis*". Plant Molecular Biology 59:927-944.

**Bolwell** (1999). "Role of active oxygen species and NO in plant defense responses". Curr. Opin. Plant Biol. 2: 287-294.

**Boudart, Dechampguillaume *et al.*** (1995). "Elicitors and Suppressors of Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Accumulation Are Solubilized from Plant-Cell Walls by Endopolygalacturonase". Eur. J. Biochem. 232: 449-457.

**Boudreau and Bissell** (1998). "Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells". Curr. Opin. Cell Biol. 10: 640-646.

**Boulton** (2006). "Biochemistry and molecular biology". Wormbook, The online review of C. elegans Biology.

**Braccini and Perez** (2001). "Molecular basis of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited". Biomacromolecules 2: 1089-1096.

- Cabrera, Boland *et al.*** (2008). "Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity". Glycobiology 18: 473-482.
- Campbell** (1995). "Biologie". DeBoeck Université.
- Carpita and McCann** (2000). "The cell wall. In Biochemistry and Molecular Biology of Plants". Edited by Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL 52-108.
- Chinchilla, Bauer *et al.*** (2006). "The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception". Plant Cell 18: 465-476.
- Cosgrove** (1997). "Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants". Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13: 171-201.
- Cosgrove** (2001). "Plant cell walls: Wall-associated kinases and cell expansion". Current Biology 11: 558-559.
- Côté and Hahn** (1994). "Oligosaccharins-Structures and Signal-Transduction". Plant Molecular Biology 26: 1379-1411.
- Decreux and Messiaen** (2005). "Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation". Plant and Cell Physiology 46: 268-278.
- Decreux, Thomas *et al.*** (2006). "In vitro characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis". Phytochemistry 67: 1068-1079.
- Esquerré-Tugayé, Boudart *et al.*** (2000). "Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens". Plant Physiology and Biochemistry 38: 157-163.
- Fields and Song** (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions". Nature 340: 245-246.
- Garrett, Grisham *et al.*** (2000). "Biochimie". De Boeck Université.
- Haffani, Silva *et al.*** (2004). "Receptor kinase signalling in plants". Can. J. Bot. 82: 1-15.
- He, Cheeseman *et al.*** (1999). "A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, WAK1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*". Plant Molecular Biology 39: 1189-1196.
- He, Z. , He, D. *et al.*** (1998). "Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response". Plant Journal 14: 55-63.
- Hématy and Höfte** (2008). "Novel receptor kinases involved in growth regulation". Curr. Opin. Plant Biol. 11: 321-328.

- Hématy, Sado *et al.*** (2007). "A receptor-like kinase mediates the response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis". Current Biology 17: 922-931.
- Horn, Heinsteins *et al.*** (1989). "Receptor-Mediated Endocytosis in Plant-Cells". Plant Cell 1: 1003-1009.
- Humphrey, Bonetta *et al.*** (2007). "Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors". New Phytologist 176: 7-21.
- Kohorn** (2001). "WAKs, cell wall associated kinases-Commentary". Curr. Opin. Cell Biol 13: 529-533.
- Kohorn, Kobayashi *et al.*** (2006). "Wall-associated kinase 1 (WAK1) is crosslinked in endomembranes, and transport to the cell surface requires correct cell-wall synthesis". Journal of Cell Science 119: 2282-2290.
- Kohorn, Lane *et al.*** (1992). "An *Arabidopsis* Serine Threonine Kinase Homolog with an Epidermal Growth-Factor Repeat Selected in Yeast for Its Specificity for a Thylakoid Membrane-Protein". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10989-10992.
- Lally, Ingmire *et al.*** (2001). "Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology". Plant Cell 13: 1317-1331.
- Low and Merida** (1996). "The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction". Physiologia Plantarum 96: 533-542.
- Messiaen and Vancustem** (1994). "Pectic Signal-Transduction in Carrot Cells-Membrane, Cytosolic and Nuclear Responses Induced by Oligogalacturonides". Plant and Cell Physiology 35: 677-689.
- Mohnen** (2008). "Pectin structure and biosynthesis". Curr. Opin. Plant Biol. 11: 266-277.
- Morris , Powell *et al.*** (1982). "Conformations and interactions of pectins: I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate". J. Mol. Biol. 155: 507-516.
- Müssig and Altmann** (2001). "Brassinosteroid signaling in plants". Trends in Endocrinology and metabolism 12.
- Nam and Li** (2002). "BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling". Cell 110: 203-212.
- Orozco-Cardenas and Ryan** (1999). "Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway". Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 6553-6557.
- Orozco-Cardenas, Mcgurl *et al.*** (1993). "Expression of an Antisense Prosystemin Gene in Tomato Plants Reduces Resistance toward *Manduca-Sexta* Larvae". Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 8273-8276.

**Park, Yun *et al.*** (2001). "Interaction of the *Arabidopsis* receptor protein kinase Wak1 with a glycine rich protein AtGRP3". J. Biol. Chem. 276: 26688-26693.

**Pritchard** (1994). "The Control of Cell Expansion in Roots". New Physiologist 127: 3-26.

**Reymond, Kunz *et al.*** (1996). "Cloning of a cDNA Encoding a Plasma Membrane-Associated, Uronide Binding with Physical Properties Similar to Viral Phosphoprotein Movement Proteins". Plant Cell 8.

**Reymond, Grunberger *et al.*** (1995). "Oligogalacturonide Defense Signals in Plants - Large Fragments Interact with the Plasma-Membrane *in-vitro*". Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 4145-4149.

**Ridley, O'Neill *et al.*** (2001). "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling". Phytochemistry 57: 929-967.

**Shiu and Bleecker** (2001). "Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases". Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 10763-10768.

**Silva and Goring** (2002). "The proline-rich, extensin-like receptor kinase-1 (PERK1) gene is rapidly induced by wounding". Plant Molecular Biology 50: 667-685.

**Simpson, Ashford *et al.*** (1998). "Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants". Glycobiology 8: 579-583.

**Sivaguru, Ezaki *et al.*** (2003). "Aluminium-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*." Plant Physiology 132: 2256-2266.

**Spiro, Ridley *et al.*** (1998). "Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures". Plant Physiology 116: 1289-1298.

**Stone and Walker** (1995). "Plant Protein-kinase Families and Signal-Transduction". Plant Physiology 108: 451-457.

**The *Arabidopsis* initiative** (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*". Nature 408: 795-815.

**Verica and He** (2002). "The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family". Plant Physiology 129: 455-459.

**Vincken, Schols *et al.*** (2003). "If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture". Plant Physiology 132: 1781-1789.

**Wagner and Kohorn** (2001). "Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion". Plant Cell 13: 303-318.

**Walhout and Vidal** (2001). "High-Troughput Yeast Two-Hybrid Assays for Large-Scale Protein Interaction Mapping". Methods 24: 297-306.

**Wang, Li *et al.*** (2005). “Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1”. Developmental Cell 8: 855-865.

**Wang, Seto *et al.*** (2001). “BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids”. Nature 411: 219-219.

**Willats, McCartney *et al.*** (2001). “Pectin: cell biology and prospects for functional analysis”. Plant Molecular Biology 47: 9-27.

**Yang, Oh *et al.*** (2003). “Oxygen-evolving enhancer protein 2 is phosphorylated by glycine-rich protein 3/wall-associated kinase 1 in *Arabidopsis*”. Biochemical and Biophysical Research Communications 305: 862-868.

**Zhang** (1998). “Leucine-rich repeat receptor-like kinases in plants”. Plant Molecular Biology Reporter 16: 301-311.